

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**TOLERÂNCIA A *Phytophthora cinnamomi* DE PORTA-
ENXERTOS DE ABACATEIRO E PROPAGAÇÃO *in vitro***

Edwin Antonio Gutierrez Rodriguez

Engenheiro Agrônomo

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**TOLERÂNCIA A *Phytophthora cinnamomi* DE PORTA-
ENXERTOS DE ABACATEIRO E PROPAGAÇÃO *in vitro***

Edwin Antonio Gutiérrez Rodríguez

Orientadora: Profa. Dra. Renata Aparecida de Andrade

Coorientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Panizzi

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Produção Vegetal).

2016

R696t Rodriguez, Edwin Antonio Gutierrez
Tolerância a *Phytophthora cinnamomi* de porta-enxertos de
abacateiro e propagação *in vitro* / Edwin Antonio Gutierrez Rodriguez.
-- Jaboticabal, 2016
xxii, 141 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientador: Renata Aparecida de Andrade
Co-Orientador: Rita de Cassia Panizzi
Banca examinadora: Priscila Lupino Gratão, Eduardo Custódio
Gasparino, Tatiana Eugenia Cantuarias Avilés, Simone Rodrigues da
Silva

Bibliografia

1. *Persea americana*-mudas. 2. *Phytophthora cinnamomi*. 3.
Fitotecnia. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 634:653

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: TOLERÂNCIA A *Phytophthora cinnamomi* DE PORTA-ENXERTOS DE
ABACATEIRO E PROPAGAÇÃO *in vitro*

AUTOR: EDWIN ANTONIO GUTIÉRREZ RODRÍGUEZ
ORIENTADORA: RENATA APARECIDA DE ANDRADE
COORIENTADORA: RITA DE CÁSSIA PANIZZI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA
(PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. RENATA APARECIDA DE ANDRADE
Departamento de Produção Vegetal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. PRISCILA LUPINO GRATÃO
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. EDUARDO CUSTODIO GASPARINO
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. TATIANA EUGENIA CANTUARIAS AVILÉS
Departamento de Fitotecnia/Fruticultura / ESALQ - USP - Piracicaba/SP



Profa. Dra. SIMONE RODRIGUES DA SILVA
Departamento de Produção Vegetal / ESALQ - USP - Piracicaba/SP

Jaboticabal, 06 de setembro de 2016.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

EDWIN ANTONIO GUTIERREZ RODRIGUEZ – nascido em 20 de abril de 1986, na cidade de Villavicencio, Meta (Colômbia), filho de Carlos Alfredo Gutierrez Rojas e Alcira Rodriguez Diaz. Engenheiro agrônomo em 2008 pela *Universidad de los Llanos* (UNILLANOS) na *Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales* em Villavicencio (Colômbia). É bolsista desde 2011 do programa do *Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación* (COLCIENCIAS) no programa do governo colombiano para formação de doutores no exterior. Em fevereiro de 2013 recebeu título de Mestre em Fitotecnia: área de concentração Horticultura pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil. Desde março de 2013 é aluno de doutorado em Agronomia (Produção Vegetal) na FCAV/UNESP. Durante o doutorado realizou estágio acadêmico na área de ecofisiologia de frutíferas no *Tropical Research and Educational Center* da *University of Florida* sob supervisão do Dr. Bruce Schaffer.

*A Deus que através da perfeição que só Ele tem, me
deu a família, os amigos, o amor e a vida.*

AGRADECIMENTOS

Neste caminho de cinco anos que está chegando ao fim, fica o rasto do caminho, mas um rasto inapagável, em que também quis ajudar na caminhada de algumas pessoas que caminharam junto, mas também com certeza recebi o apoio para continuar.

Foi uma época das mais egoístas da minha vida. Conheci pessoas inesquecíveis que não vou ter como pôr na mala, situações de confronto até quebrantar o meu orgulho, verdades certas que com um sopro se perderam, mas também de construção de novos caminhos. Foi um filtro sem dúvida alguma.

Com a limitação que tem a nossa linguagem e que impõem as palavras gostaria de agradecer:

À minha Família, especialmente meus pais, irmãos, e sobrinhos, pelo apoio neste tempo fora do país e quem sempre me apoiou. Ao meu amor, Fleurzinha, você sabe quão importante é na minha vida.

À Dra. Renata Aparecida de Andrade, pelos ensinamentos e oportunidade. Por ter me recebido para fazer parte desta grande família UNESPIANA. Com certeza foi um grande aprendizado pessoal e profissional.

Ao pessoal do departamento de Produção vegetal, especialmente aos professores Antônio, Arthur, Pedro, com o mesmo sentimento, ao pessoal administrativo, Senhora Rosane, Wagner, Sydneia e do ripado de fruticultura, especialmente ao senhor Bedim, que são tão importantes no crescimento e consolidação da nossa formação.

Ao pessoal da Fitopatologia, da Rosangela e aos professores que de forma distinta apoiaram não só o desenvolvimento deste trabalho como também do meu crescimento. Especialmente à professora Dra. Rita, seu apoio foi imensurável.

Ao pessoal do departamento de Tecnologia, particularmente ao Dr. Tiago Santana Balbuena pelo apoio pessoal no processo de formação e às alunas sob sua orientação pelo ser humano que elas são.

Ao pessoal do departamento de Biologia, Roseli, Sonia e o professor Eduardo no apoio para o enriquecimento do trabalho, mas acima de tudo pela confiança e colocar a humanidade acima do interesse científico.

Ao pessoal da APTA, especialmente ao Dr. Eduardo Feichtenberger e a Junia Nais, pelo treinamento, pela concessão dos isolados de *P. cinnamomi* e acima de tudo pelos conselhos e ensinamentos.

Aos grandes amigos e amizades, sem nomes, pois cada um sabe a medida da minha gratidão, que me fizeram entender o quanto temos para aprender um com o outro, e que o mundo não é tão grande como nós imaginamos.

Durante o sanduiche no *Tropical Research and Educational Center* (TREC), gostaria de deixar na memória, essa curta, mas inesquecível passagem pelo instituto que sem dúvidas foi muito além do proposto. No âmbito acadêmico, ao Dr. Bruce Schaffer pela oportunidade de viver a experiência junto ao seu grupo de pesquisa e interagir com as demais pessoas do TREC. Aos professores Dr. Jonathan Crane pela oportunidade de participar do excelente curso em Fruticultura Tropical, e ao professor Dr. Wagner Vendrame por ter sido a ponte e apoio no processo de busca do estágio. Ao staff do TREC, especialmente a Maria, Ana, Pam, Wanda, Tina, Patrícia, aos estudantes, especialmente Raiza, Octavio, Stephanie, Razzak, Gina, e a cada uma das pessoas que fizeram tão enriquecedor esse período do TREC.

Finalmente, se eu tivesse que resumir em uma palavra estes cinco anos da minha vida, esta seria “oportunidade”. Tenho a certeza que no significado desta palavra encontra-se o “segredo” para as mudanças que o nosso mundo demanda. Acredito que foi pela oportunidade que Deus através das pessoas, me deu durante este tempo, que hoje estou finalizando com imensa gratidão esta fase da minha vida.

MUITO OBRIGADO!!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xix
LISTA DE APÊNDICES	xxii
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais	1
1.1 Introdução	1
1.2 Revisão de Literatura	3
1.2.1 Propagação de abacateiro no contexto da abacaticultura comercial	3
1.2.2 <i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands	6
1.2.3 Porta-enxertos 'Duke 7' e 'Toro canyon'	9
1.2.4 Ferramentas biotecnológicas na superação das limitações para produção de abacate	11
1.2.5 Ferramentas biotecnológicas na superação das limitações para produção de abacate	10
1.3 Referências	12
CAPÍTULO 2 – Índice de clorofila e eficiência quântica do fotossistema II em plântulas de Persea americana Miller: padronização de parâmetros para medição	21
Resumo	21
Abstract	22
2.1 Introdução	23
2.2 Material e Métodos	25
2.3 Resultados e Discussão	28
2.3.1 Lado e posição da folha no perfil de plântulas de 'Duke 7' e 'Toro canyon' para determinação do Índice de clorofila	28
2.3.2 Parâmetro de tempo de aclimação no escuro, intensidade e tempo de exposição de luz na determinação da eficiência quântica do fotossistema II de plântulas de 'Duke 7' e 'Toro canyon'	30
2.4 Conclusões	37
2.5 Referências	38

CAPÍTULO 3 – Resposta de dois porta-enxertos de <i>Persea americana</i>, obtidos por sementes, na presença de <i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands	43
Resumo.....	43
Abstract.....	44
3.1 Introdução	45
3.2 Material e Métodos	47
3.2.1 Definição prévia do isolado	47
3.2.2 Tolerância de mudas de abacateiro obtidas por sementes dos clones ‘Duke 7’ e ‘Toro canyon’ a <i>Phytophthora cinnamomi</i>	48
3.2.2.1 Obtenção de mudas de abacateiro ‘Duke 7’ e ‘Toro canyon’	48
3.2.3 Avaliação fisiológica das mudas durante o desenvolvimento da doença.....	52
3.2.3.1 Análise estatística	53
3.2.4 Avaliação biométrica das mudas durante o desenvolvimento da doença.....	53
3.2.4.1 Análise estatística	54
3.2.4.2 Análise de correlação	54
3.2.5 Caracterização histológica por microscopia ótica do caule de plantas de abacateiro, na região de inoculação com <i>Phytophthora cinnamomi</i>	55
3.2.5.1 Análise estatística	56
3.2.6 Caracterização histológica por microscopia de varredura.....	57
3.3 Resultados e Discussão.....	57
3.3.1 Definição prévia do isolado	57
3.3.2 Tolerância de mudas de abacateiro obtidas por sementes dos clones ‘Duke 7’ e ‘Toro canyon’ a <i>Phytophthora cinnamomi</i>	58
3.3.3 Alterações fisiológicas das mudas durante o processo da doença.....	59
3.3.4 Alterações biométricas das mudas de abacateiro durante o desenvolvimento da doença	65
3.3.5 Análise de correlação entre as variáveis biométricas e o índice de clorofila	69
3.3.6 Alterações histológicas do caule na região de inoculação por microscopia ótica	73
3.3.7 Alterações histológicas na região de inoculação por microscopia de varredura	77

3.4 Conclusões	80
3.5 Referências.....	80
CAPÍTULO 4 – Estabelecimento <i>in vitro</i> de explantes de <i>Persea americana</i> de materiais usados como porta-enxerto	90
Resumo.....	90
Abstract.....	91
4.1 Introdução	92
4.2 Material e Métodos	94
4.2.1 Preparo do meio de cultivo e condições da sala de crescimento.....	94
4.2.2 Teste 1 – Tempo de imersão em solução de hipoclorito de sódio na desinfestação de miniestacas.....	95
4.2.3 Teste 2 – Comparação de hipoclorito de sódio e ácido tricloro isocianurico na desinfestação de gemas apicais	96
4.2.4 Teste 3 – Estabelecimento <i>in vitro</i> de explantes estiolados de material adulto proveniente de mudas por enxertia.....	98
4.3 Resultados e Discussão.....	100
4.3.1 Teste 1 – Tempo de imersão em solução de hipoclorito de sódio na desinfestação de miniestacas.....	100
4.3.2 Teste 2 – Desinfestação de gemas apicais comparando hipoclorito de sódio e ácido tricloro isocianúrico.....	101
4.3.3 Teste 3 – Estabelecimento <i>in vitro</i> de explantes estiolados de material adulto proveniente de mudas por enxertia.....	107
4.4 Conclusões	108
4.5 Referências.....	109
CAPÍTULO 5 – Armazenamento de embriões no desenvolvimento <i>in vitro</i> de eixos embrionários de <i>Persea americana</i> Mill	116
Resumo.....	116
Abstract.....	117
5.1 Introdução	118
5.2 Material e Métodos	119
5.2.1 Variabilidade morfológica em embriões de abacateiro ‘Toro canyon’ e ‘Duke 7’	119

5.2.2 Testes de armazenamento de embriões e posterior viabilidade para desenvolvimento <i>in vitro</i> dos eixos embrionários.....	120
5.2.3 Armazenamento do embrião e meio de cultivo no desenvolvimento <i>in vitro</i> de eixos embrionários.....	122
5.2.4 Viabilidade de eixos embrionários de embriões de abacateiro ‘Duke 7’ armazenados por seis meses	123
5.3 Resultados e Discussão.....	124
5.3.1 Variabilidade morfológica em embriões de abacateiro ‘Toro canyon’ e ‘Duke 7’	124
5.3.2 Armazenamento do embrião por dois meses e meio de cultivo no desenvolvimento <i>in vitro</i> de eixos embrionários.....	126
5.3.3 Viabilidade de eixos embrionários de embriões de abacateiro ‘Duke 7’ armazenados por seis meses	129
5.3.4 Alterações biométricas das mudas durante o desenvolvimento da doença.....	118
5.3.5 Análise de correlação entre as variáveis biométricas e o índice de clorofila	122
5.3.6 Alterações histológicas do caule na região de inoculação por microscopia ótica	126
5.4 Conclusões	130
5.5 Referências.....	130
APÊNDICES	136
Apêndice 1	137
Apêndice 2	138
Apêndice 3	139
Apêndice 4	140
Apêndice 5	141

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Categoria de pesquisa realizada envolvendo a cultura do abacateiro entre 1991-2014 (a) e 2014 (b). Fonte: Adaptado de: Searchcrossref.org	2
Figura 2. Distribuição atual de <i>Phytophthora cinnamomi</i> no mundo. Fonte: EPPO, 2015	7
Figura 3. Ciclo biológico de <i>Phytophthora cinnamomi</i> entre o substrato e o tecido radicular, detalhando a participação da raiz, na atração inicial dos zoósporos (A) participação da matriz da mucilagem na defesa da planta (B) e liberação de metabolitos que participam no controle do patógeno (C) e fases subsequentes entre as raízes e rizosfera das plantas. Fonte: Adaptado de Baetz e Martinola & Dieback working group.....	8
Figura 4. Fruto (a) semente (b) e planta adulta (c) dos materiais de abacateiro 'Toro canyon' (superior) e 'Duke 7' (inferior)	10
Figura 5. Diagrama para determinação dos parâmetros de avaliação do índice de clorofila em mudas de abacateiro, desde a folha dois até a folha catorze no sentido basípeto.....	26
Figura 6. Diagrama para determinação dos parâmetros tanto da pré-aclimatação no escuro quanto da duração e intensidade da iluminação da área foliar para medição da fluorescência da clorofila em folhas de abacateiro.....	27
Figura 7. Análise de regressão do índice de clorofila a, b e total no perfil das plântulas de abacateiro. 'Duke 7' para determinação dos parâmetros de avaliação	28
Figura 8. Espectro de cor das folhas em mudas de abacateiro var. 'Toro canyon' (esquerda) e 'Duke 7'(direita) digitalizadas com Image Scanner III™ e analisadas com Image Master software 2D Platinum ver. 7.0 ™ (Do menor para o maior, o número indica a posição da folha no sentido basipeto).	29

- Figura 9.** Análise de regressão da interação entre intensidade luminosa e tempo de pré-aclimatação no escuro na determinação dos parâmetros para medição da relação de fluorescência Fv/Fm em plântulas de abacateiro 'Duke 7' 32
- Figura 10.** Análise de regressão da interação entre tempo de iluminação e tempo de pré-aclimatação no escuro na determinação dos parâmetros para medição da relação de fluorescência Fv/Fm em plântulas de abacateiro 'Duke 7' 33
- Figura 11.** Análise de regressão da interação entre intensidade luminosa e tempo de pré-aclimatação no escuro na determinação dos parâmetros para medição da relação de fluorescência Fv/Fm em plântulas de abacateiro 'Toro canyon' 34
- Figura 12.** Análise de regressão da interação entre tempo de iluminação e a intensidade da fonte de luz na determinação dos parâmetros para medição da relação de fluorescência Fv/Fm em plântulas de abacateiro 'Toro canyon' 35
- Figura 13.** Análise de regressão da interação entre exposição luminosa e tempo de pré-aclimatação no escuro na determinação dos parâmetros para medição da relação de fluorescência Fv/Fm em plântulas de abacateiro 'Toro canyon' 36
- Figura 14.** Sistema Digital de Análise de Imagem-Delta T Devices usado para quantificação da área a partir do desenho da lesão no caule causada por *Phytophthora cinnamomi* em mudas de abacateiro 48
- Figura 15.** Temperatura máxima e mínima na casa de vegetação durante o tempo de condução do experimento de resposta de mudas por semente de abacateiro à inoculação com *Phytophthora cinnamomi* 49
- Figura 16.** Metodologia de inoculação e avaliação do desenvolvimento da lesão causada por *P. cinnamomi* no caule de mudas de abacateiro. 1. Muda obtida de semente; 2. Tratamento sem ou com ferimento; 3. Meio Cenoura-Agar com *P. cinnamomi*; 4. Porção de meio colocada na base do caule; 5. Área da lesão após 15 dias 50

Figura 17. Sequência geral para inoculação no caule de mudas de abacateiro: a. porção de Meio usado como inoculo; b. Porção de meio na base do caule; c, d. Cobertura com porção de algodão; e, f. Fita para manter a aderência e evitar contaminação 50

Figura 18. Método de isca com pétalas de rosa usado para detecção de *Phytophthora cinnamomi* em substrato; a: Iscas de pétalas na solução água + substrato; b: Esporângios formados na borda da porção de pétala usada como isca após quatro dias..... 51

Figura 19. Quantificação da eficiência quântica do FS II em mudas de abacateiro; na sétima folha completamente expandida, prévia aclimatação no escuro, utilizado fluorômetro. 52

Figura 20. Metodologia usada para medição do volume de raiz em mudas de abacateiro após inoculação com *Phytophthora cinnamomi*. Volume inicial de água mais sistema radicular (A) e volume final de água (B) 54

Figura 21. Diagrama das regiões do caule de abacateiro tratado (esquerdo) e intacto (direito) para medir as alterações causadas pelo *Phytophthora cinnamomi*: espessura da epiderme (1), floema (2), xilema (3), e diâmetro médio dos vasos do xilema secundário (4) 55

Figura 22. Regressão da análise de variância do índice de clorofila A (chl A), B (chl B), Total (chl Total) em mudas de abacateiro ‘Toro canyon’ (a) e ‘Duke 7’ (b) e a relação a/b (c) durante 97 dias a partir da inoculação com *Phytophthora cinnamomi* 62

Figura 23. Regressão da análise de variância em função do tempo da interação entre o material: Toro canyon (direita) e D7 (esquerda) e o tratamento de inoculação com *P. cinnamomi* em mudas de abacateiro, no crescimento em altura (superior) e diâmetro do caule (inferior)..... 66

Figura 24. Sistema radicular de mudas de abacateiro após seis meses de inoculação no substrato com *Phytophthora cinnamomi*, a. Raiz de mudas de D7; b. Raiz de mudas de TC; (escala= 15 cm) 69

Figura 25. Região de xilema em caule de abacateiro com presença de micélio de *Phytophthora cinnamomi* com aumento de 40x (a), 100x (b) e 400x (c). A seta vermelha indica a região de localização do micélio, assim como tecido intacto (d, f) e tecido inoculado (e, g) 75

Figura 26. Região de inoculação com *Phytophthora cinnamomi* em caule de mudas de abacateiro após 45 dias. Secção transversal de Toro canyon (a) e Duke 7 (b); vista externa na epiderme (c) e corte longitudinal (d) da lesão 76

Figura 27. Eletromicrografia de varredura da secção transversal do caule de mudas de abacateiro ‘Toro canyon’ (esquerda) e ‘Duke 7’ (direita) 78

Figura 28. Eletromicrografia de varredura na região da base do caule de mudas de abacateiro ‘Toro canyon’ (Esquerda) e ‘Duke 7’ (direita) sob incidência de *P. cinnamomi* 15 dias após a inoculação, observando-se abundante micélio (seta vermelha) (a, b) e presença de grãos de polissacarídeos (seta amarela) nos vasos do xilema (c), vista general da região dos sintomas (d) 79

Figura 29. Obtenção de mini estacas de abacateiro ‘Duke 7’ de plantas adultas para estabelecimento in vitro. a) Seleção de ramos da planta matriz; b) Pré-lavagem; c) Retirada das folhas; d) Explantes em meio de cultivo SHm..... 95

Figura 30. Explantes juvenis de abacateiro ‘Duke 7’ para o estabelecimento in vitro de gemas apicais obtidas de plantas adultas, a. brotação para obtenção da gema, b. gema para estabelecimento in vitro, c. Gema excisada e disposta no meio de cultivo SHm. 97

Figura 31. Sequência para obtenção de explantes estiolados de abacateiro para estabelecimento in vitro a partir de plantas enxertadas. A) Enxertia em fenda cheia; b) Desenvolvimento das gemas do enxerto; c) Multibrotação induzida pela quebra da dominância apical; d) Brotações incubadas no escuro; e) Comparação de brotações

normais (esquerda) e estioladas (direita); e f) Miniestaca axênica em meio de cultivo 99

Figura 32. Sintomas de necrose em enxertos de abacateiro ‘Toro canyon’ em condições de casa de vegetação associados com estresse por alta temperatura; a. Necrose apical; b. Queima inicial das folhas; c. Sintoma das folhas após abscisão 107

Figura 33. Percentual de contaminação por microrganismos formadores de micélio (MFM) e formadores de colônias (MFC) obtidos de brotações estioladas, quando tratados com hipoclorito de sódio (1% m/m) por 10 e 20 minutos, para o estabelecimento in vitro de explantes de abacateiro..... 108

Figura 34. Desenho de embrião e eixo embrionário de abacateiro para extração e estabelecimento in vitro. a: Partes do embrião com a região de união cotiledonar, b. Eixo embrionário separado usado para estabelecimento in vitro. 2016. Adaptado de Lady of Hats- avocado seed..... 120

Figura 35. Preparo de sementes de abacateiro para armazenamento e estabelecimento in vitro de eixos embrionários. a: Imersão em NaOCl (1,5% i.a); b. Sementes após desinfestação; c. Separação para extração do eixo embrionário; d. Eixo embrionário; e. Desenvolvimento inicial em meio de cultivo 121

Figura 36. Procedimento geral do preparo das sementes de abacateiro. ‘Duke 7’ para armazenamento (10°C) por 60 dias em saco plástico..... 122

Figura 37. Desenvolvimento in vitro de eixos embrionários de abacateiro ‘Toro canyon’ em meio de cultivo semissólido. a) separação para extração do eixo embrionário; b) desenvolvimento apical; c) fase de roseta; d) enraizamento e desenvolvimento apical 123

Figura 38. Sequência geral do preparo para armazenamento de embriões de abacateiro em BOD (10 °C) por seis meses 123

Figura 39. Aspecto do embrião e variação morfológica do eixo embrionário de abacateiro ‘Duke 7’ (a, b, c) e ‘Toro canyon’ (d, e, f), (barra = 1cm) 125

Figura 40. Sobrevivência e enraizamento de eixos embrionários de abacateiro sem armazenamento sob condições in vitro nos meios de cultivo MS, MS (30%) e SHm. a, b: ‘Duke 7’; c: ‘Toro canyon’. *Letras nas barras mostram diferença significativa pelo teste Scott-knott ($p \leq 0,05$) quando significativo ao nível de significância de 5% pelo teste F 126

Figura 41. Comparação dos principais sais (a, b) e elementos químicos constituintes (c) entre o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e o SHm (SCHENK; HILDEBRANDT, 1972)..... 128

Figura 42. Regressão da análise de variância do desenvolvimento da parte aérea e radicular de eixos embrionários de abacateiro ‘Duke 7’ 129

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Análise de variância dos efeitos principais e as interações entre intensidade luminosa, tempo de pré-aclimatação no escuro e tempo de exposição à luz, na determinação dos parâmetros para medição da relação de fluorescência Fv/Fm em plântulas de abacateiro 'Duke 7'.....	31
Tabela 2. Análise de variância dos efeitos principais e as interações entre intensidade luminosa, tempo de pré-aclimatação no escuro e tempo de exposição à luz, na determinação dos parâmetros para medição da relação de fluorescência Fv/Fm em plântulas de abacateiro 'Toro canyon'	34
Tabela 3. Identidade dos isolados de <i>Phytophthora cinnamomi</i> da Micoteca "Dra. Victoria Rosseti", Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Sorocaba, usados para teste de patogenicidade	47
Tabela 4. Resumo da análise de variância da interação em mudas de abacateiro 'Toro canyon' e 'Duke 7' com e sem ferimento mecânico, sobre a área da lesão no caule após 15 dias causada por <i>Phytophthora cinnamomi</i>	58
Tabela 5. Análise de variância e de regressão do índice de clorofila A, B e Total em mudas por semente de abacateiro 'Toro canyon' (TC) e 'Duke 7' (D7) inoculadas com <i>Phytophthora cinnamomi</i> pelos métodos: Inoculação sem ferimento, Inoculação com ferimento e presença no substrato.....	60
Tabela 6. Análise de variância do índice de clorofila A, B e Total após 97 dias de inoculação com <i>Phytophthora cinnamomi</i> em mudas de Toro canyon e Duke 7	63
Tabela 7. Resumo da análise de variância da eficiência quântica do FS II - Fv/Fm em mudas de abacateiro quando inoculadas com <i>Phytophthora cinnamomi</i> , no momento da inoculação (0d) e após sete (7 d) e sessenta dias (60 d).....	64

Tabela 8. Resumo da análise de variância da altura e diâmetro de mudas de abacateiro ‘Duke 7’ e ‘Toro canyon’ durante 97 dias após inoculação (DAI) com *Phytophthora cinnamomi* no caule com fermento (CF), sem fermento (SF) ou no substrato (Subs.) 65

Tabela 9. Resumo da análise de variância da taxa de crescimento relativo, em altura e diâmetro, de mudas de abacateiro inoculadas com *Phytophthora cinnamomi*..... 67

Tabela 10. Avaliação de mudas de abacateiro, ‘Toro canyon’ e ‘Duke 7’ após seis meses de inoculação com *Phytophthora cinnamomi* 68

Tabela 11. Análise de correlação de Pearson entre as variáveis biométricas avaliadas na incidência da doença causada por *Phytophthora cinnamomi* na progênie de abacateiro ‘Toro canyon’ e ‘Duke 7’ 71

Tabela 12. Análise de variância entre o material de abacateiro e a inoculação no caule com *Phytophthora cinnamomi* sobre as alterações na região da epiderme, floema e xilema..... 74

Tabela 13. Resumo da análise de variância para efeitos principais e interação quando utilizado ácido tricloro isocianúrico na contaminação com microrganismos formadores de micélio (MFM) ou colônia (MFC) para estabelecimento *in vitro* de explantes de abacateiro..... 102

Tabela 14. Desdobramento da interação entre o tempo de imersão (A) e a concentração do ácido tricloro isoianúrico - ATI (B) sobre o percentual de explantes contaminados por microrganismos formadores de micélio para estabelecimento *in vitro* de explantes de abacateiro..... 102

Tabela 15. Resumo da análise de variância para efeitos principais e interação, no percentual de explantes contaminados com microrganismos formadores de micélio (MFM) ou colônia (MFC) quando utilizado hipoclorito de sódio na desinfestação para estabelecimento *in vitro* de explantes de abacateiro..... 103

Tabela 16. Resumo da análise de variância para efeitos principais e interação dos produtos químico (A), tempo de tratamento (B) e concentração do produto (C) na desinfestação de explantes para estabelecimento *in vitro* de Abacateiro 104

Tabela 17. Desdobramento da interação entre o produto utilizado no tratamento (A) e o tempo de imersão (B) sobre o percentual de explantes de abacateiro axênicos para estabelecimento *in vitro*..... 105

Tabela 18. Desdobramento da interação entre os produtos, ácido tricloro isocianurico (ATI) e Hipoclorito de sódio (NaOCl) (A) e a concentração (C) sobre o percentual de explantes de abacateiro axênicos para estabelecimento *in vitro*..... 105

Tabela 19. Biometria de eixos embrionários dos materiais ‘Duke 7’ e ‘Toro canyon’ de abacateiro..... 124

Tabela 20. Porcentagem média de sobrevivência, enraizamento e desenvolvimento *in vitro* de eixos embrionários sem armazenamento de abacateiro ‘Duke 7’ e ‘Toro canyon’ em meio de cultivo após 60 dias de incubação..... 126

LISTA DE APÊNDICES

	Página
Apêndice 1 – Condições de temperatura e umidade da sala de crescimento para o desenvolvimento dos explantes obtidos por enxertia usados para micropropagação.....	137
Apêndice 2 – Irradiância na casa de vegetação para o desenvolvimento das mudas de abacateiro sob tratamento com <i>Phytophthora cinnamomi</i> . A Área para mudas de Toro canyon; b. Área para mudas de Duke 7 (os quadrados vermelhos indicam a localização das plantas)	138
Apêndice 3 – Preparo das lâminas para microscopia ótica do caule de mudas de abacateiro na região de inoculação com <i>Phytophthora cinnamomi</i> : Serie gradual de álcool utilizada na desidratação; Coloração utilizada no preparo para análise das laminas histológicas	139
Apêndice 4 – Análise química da água usada durante o desenvolvimento do experimento para irrigação das mudas de abacateiro inoculadas com <i>Phytophthora cinnamomi</i>	140
Apêndice 5 – Composição do meio de cultivo <i>Cenoura-Agar</i> e <i>Lima Bean Agar</i> para crescimento de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	141

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1.1 Introdução

O abacateiro (*Persea americana* Miller) da Lauraceae é originário da América central e encontra-se distribuído em 67 países, principalmente na América Latina, República Dominicana, Indonésia e Estados Unidos (FAO, 2013). O gênero *Persea* sp. se constitui de espécies polimórficas, compostas por variedades selvagens (var. *flocosa*, var. *steryermarkii*, var. *nubigena*) e raças de interesse econômico: var. *americana* Miller (West Indian); var. *guatemalense* (*Guatemalenses*) e var. *mexicana* (*drymifolia*) (SCORA; BERGH, 1990; ASHWORTH; CLEQQ, 2003). A raça mexicana mostra-se mais adaptada ao frio, enquanto que a guatemalense geralmente é mais produtiva e apresenta frutos superiores em qualidade (SCORA; BERGH, 1990).

A área mundial destinada à cultura do abacateiro é aproximadamente 500.000 ha, sendo México o maior produtor (121.000 há)., a Colômbia o terceiro (25.000 ha) e o Brasil o oitavo (11.000 ha) (FAO, 2013). No Brasil existem aproximadamente 11.000 ha, sendo São Paulo o principal Estado produtor, com 54% do total nacional (DORIZZOTTO et al., 2011). Dentre a produção comercial, os cultivares tipo Hass são os mais plantados em pomares que objetivam a produção para exportação (CRANE et al., 2013), devido, entre outras características, à sua adaptabilidade e conservação na pós-colheita, assim como a alta produtividade (ERNST, 2007).

O panorama do consumo é também crescente, possivelmente devido aos benefícios na saúde humana. Segundo Hoffmann (2010), há crescente evolução do consumo *per capita* de abacate nos últimos anos, sendo, porém, ainda muito inferior ao consumo de outros tipos de frutos disponíveis no mercado.

As pesquisas desenvolvidas com abacateiro contextualizam novas abordagens que vem sendo feitas nesta espécie. Propriedades fitoterapêuticas de compostos com atividade farmacêutica, como vasodilatador, antiviral, antioxidante (YASIR; DAS; KHARYA, 2010), agente antileucêmico (LEE et al., 2014, 2015), entre outras, têm sido referenciadas. Até 2014, mais de 60% das pesquisas com abacateiro respondem a assuntos relacionados com a produção agrícola; no entanto, a medicina, bioquímica, meio ambiente e similares são também abordadas e estudadas (Figura 1).

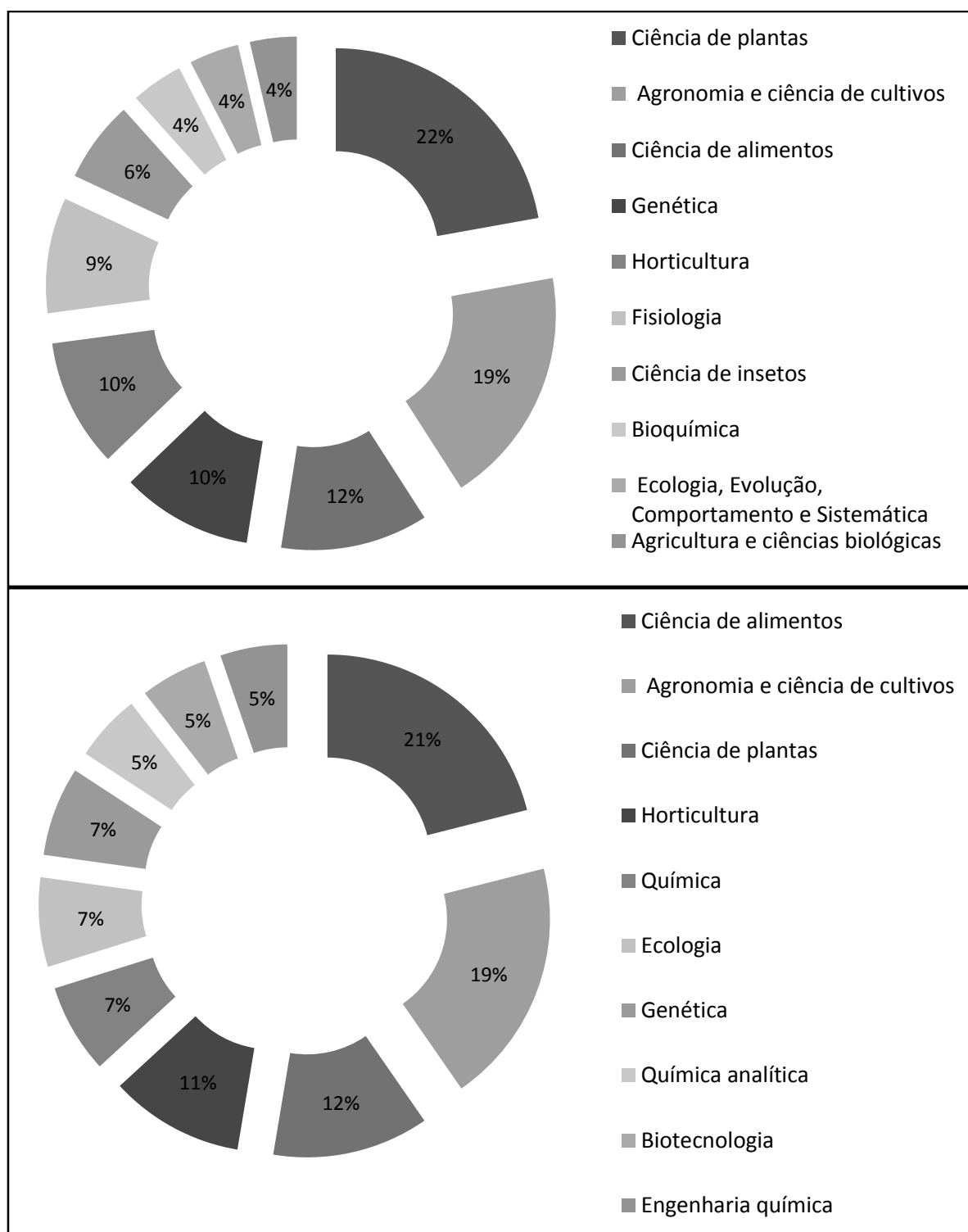


Figura 1. Categoria de pesquisa realizada envolvendo a cultura do abacateiro entre 1991-2014 (a) e 2014 (b). Fonte: Adaptado de: *Searchcrossref.org*

1.2 Revisão de Literatura

1.2.1 Propagação de abacateiro no contexto da abacaticultura comercial

A tendência mundial na fruticultura comercial demanda, cada vez mais de estratégias agrônomicas que maximizem a produtividade e uniformidade dos sistemas de produção, não só como ferramenta de mercado para diminuir custos de produção, mas também para superar a limitação pela falta de mão de obra no setor agrícola (DORANTES; PARADA; ORTIZ, 2004), bem como para diminuir os custos ambientais e sociais associados à produção em grande escala (COOK, 1983; CASWELL; SALGUERO-GÓMEZ, 2013; VILLAFÁN VIDALES; AYALA ORTIZ, 2014).

As limitações, além das referidas anteriormente, são específicas do local de produção e devem ser consideradas, tais como a variabilidade nos preços de comercialização (DORANTES; PARADA; ORTIZ, 2004), industrialização ou aproveitamento dos subprodutos (WEATHERBY; SORBER, 1931; GEISSMAN; DITTMAR, 1965; UFODIKE; ARAZU; OCHINYABO, 2006; IDRIS; NDUKWE; GIMBA, 2010; DABAS et al., 2011). Porém, no contexto agrônômico, a falta de material vegetal de qualidade para estabelecimento de novos pomares é a principal limitação.

Por macropropagação, a produção comercial de mudas de abacateiro é realizada via enxertia de variedades comerciais sobre porta-enxertos com características de interesse, cuja obtenção é principalmente via semente, comumente de plantas com polinização aberta, de origem genética desconhecida ou por clonagem via enraizamento de caule previamente estiolado segundo o protocolo inicialmente descrito por Frolich (1951) (ERNST; WHILEY; BENDER, 2013),.

Por sua vez, a propagação *in vitro* é o resultado da aplicação de ferramentas que se baseiam na expressão da totipotência celular, usando diferentes estruturas, tecidos ou células para obtenção de organismos ou partes, idênticos geneticamente ao doador. Em plantas, entre as técnicas usadas para micropropagação citam-se a organogênese direta a partir de *shoot tips*, miniestacas, gemas axilares e raízes, além de resgate de embriões zigóticos (GEORGE; HALL; KLERK, 2008).

Cada técnica tem problemas específicos que devem ser superados durante as diferentes fases da micropropagação, desde a seleção das plantas matrizes até a

aclimação das plântulas (OLMOS; LUCIANI; GALDEANO, 2004; JAIN; ISHII, 2012).

Os problemas mais frequentes que devem ser superados na micropropagação de frutíferas estão associados com a juvenilidade das plantas matrizes, bem como a contaminação e oxidação dos explantes nas primeiras fases do processo (JAIN; ISHII, 2012).

No Brasil, destacam-se na produção comercial de mudas de espécies frutíferas por micropropagação: banana, abacaxi, citros, morango, maçã, amora, uva, maracujá, mirtilo, marmelo, pera, guaraná, figo e açaí (CARVALHO; RODRIGUES; SANTOS, 2012).

No caso do abacateiro, a propagação *in vitro* como alternativa para obtenção de mudas, através de diferentes técnicas, tais como organogênese, embriogênese somática e resgate de embriões, tem sido estudada (SCHROEDER, 1979; PLIEGO-ALFARO; MURASHIGE, 1987; MOHAMED-YASSEEN, 1993; BIASI, 1995; WESSELS, 1996; VIÑA et al., 1999; BARCELO-MUÑOZ et al., 1999; PLIEGO-ALFARO et al., 1999; RAHARJO; LITZ, 2005; AVENIDO et al., 2007; SÁNCHEZ-ROMERO et al., 2007; FUENTES et al., 2013; ENCINA et al., 2014), porém poucos são os exemplos de produção comercial.

O resgate de embriões zigóticos para produção de mudas transgênicas (PERÁN-QUESADA et al., 2004) de embriões somáticos para formação *in vitro* de mudas matrizes (PERÁN-QUESADA et al., 2004; AVENIDO et al., 2007; ENCINA et al., 2014) e de lâmina foliar, embriões imaturos, caule, mesocarpo, flores e cotilédones, para indução de calogênese (MOHAMED-YASSEEN, 1993) tem sido também estudado.

Comum às técnicas anteriormente referidas, o uso de explantes provenientes de plantas adultas é limitado principalmente pela alta contaminação e baixa eficiência no estabelecimento e enraizamento (AVENIDO et al., 2007; ZULFIQAR et al., 2009).

No entanto, entre os métodos referidos, há controvérsias quanto as vantagens e desvantagens, baseadas em vários aspectos, tais como: homogeneidade, sanidade e produtividade do material (WOLSTENHOLME, 2003; DOUHAN et al., 2006; WHILEY; GIBLIN; WHILEY, 2007; ERNST; WHILEY; BENDER, 2013; GOLDSCHMIDT, 2014).

A discussão sobre a obtenção de porta-enxertos por semente ou clonagem está

aberta e são diversos os critérios expostos, diante das experiências com outras culturas, e as particularidades próprias da abacaticultura mundial. A seguir seguem algumas opiniões pessoais de pesquisadores em abacate no mundo, sobre a pergunta: *Semente ou clone na produção comercial de mudas para porta-enxerto de abacateiro?*

“Lo ideal es usar clones para producción comercial. Clones que tengan características deseadas para el lugar de producción tomando en cuenta clima, tipo de suelo, calidad de agua y resistencia a enfermedades y arquitectura del patrón. Debido a la alta variabilidad de las semillas debido a su condición híbrida no es recomendable para producción comercial.” – Patricia Manosalva, Assistant Professor & Director of the Avocado Rootstock Breeding Program- Plant Pathologist, Molecular Biologist and Biochemis, UC Davis.

“Es una pregunta que no es fácil responder, ya que ambos tienen ventajas y desventajas. La producción de plantas de semilla cuenta con diversidad genética, lo que considero ser una tremenda ventaja al conferir una base genética más amplia a las plantaciones comerciales (evitando lo que pasa en cítricos en Brasil con el limao Cravo, por ejemplo). Otra gran ventaja de las plantas de semilla es su menor costo. La desventaja es que no permiten mantener características deseadas como resistencia a enfermedades o condiciones ambientales y que no funcionan bien en casos de replante. Por otro lado, los clonales garantizan mantener características deseadas bastante específicas, pero además de su mayor costo, es mucho más difícil producir las plantas y establecerlas en campo, por lo que su uso está restringido a un número pequeño de productores más tecnificados. Tampoco permiten plantaciones en alta densidad.” – Dra. Tatiana Cantuarias-Avilés, Avocado Crop Advisor and Researcher, Brasil.

“The question of “Seedling or clonning in the commercial production of avocado rootstock?” is still a matter of controversy. It depends on the soil, climate and disease potential. In many countries or areas such as south Florida and Chile, the majority of production is on seedling rootstocks. In areas with Phytophthora root rot, such as South Africa and California, many people think that Phytophthora resistant rootstocks are better than seedling rootstocks. However, in Australia, where there is Phytophthora, a large study by A.W. Whiley showed no difference in yields throughout the country between seedling and clonal rootstocks. Seedling rootstocks tend to be variably because of the genetic diversity. Clonal rootstocks produce a more uniform trees. However, which type of rootstock is better is still a matter of controversy.” – Bruce Schaffer, Ph.D. Professor of Plant Physiology, Tropical Research and Education Center, University of Florida.

“I have nothing surprising to say. It would seem to me that once a successful rootstock is identified (successful for a certain soil and environment), it would make more sense to propagate it by vegetative cloning, so that all trees (in this particular soil/environment) will have this successful rootstock. A relatively easy and inexpensive way to produce clonal rootstocks is necessary, so that this option is affordable. It is always worthwhile to keep a large variety of seedling rootstocks in store, so that if a new soil disease appears, or the quality of water is changed, one can rapidly find a new genotype that is more appropriate for use.” – Alon Samach, Associate Professor, The Robert H.

Smith Faculty of Agriculture, Food and Environment The Hebrew University of Jerusalem.

“Definitivamente el uso de clones en plantaciones comerciales le dan la seguridad al productor que contará con un portainjerto que provocará una gran uniformidad, la cual facilita el manejo y de acuerdo a las características de cierto portainjerto se expresarán para dar resistencia o tolerancia a factores bióticos y abióticos, entre otros tipos de características vegetativas o productivas que puedan modificar al injerto.” – Alejandro Barrientos-Priego, Professor-Investigador, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo.

No entanto, assumir a tolerância a patógenos como único critério de seleção de materiais, pode desenvolver maiores problemas nas áreas de produção de abacate, uma vez que aumenta os riscos em termos de estabilidade das culturas, pois um mesmo genótipo não responde adequadamente a todas as condições limitantes em um cultivo, tais como salinidade, clima, disponibilidade de nutrientes (DOUHAN, 2009; FASSIO et al., 2009), nem a resposta diante dos patógenos potenciais como *Rafaellea lauricola* (INCH; PLOETZ, 2012), *Ilyonectria macrodidyma* (VITALE et al., 2012), *P. citrícola*, *P. palmivora*, *P. parasítica*, *Verticillium albo-atrum*, *Armillaria mellea*, *Rhizoctonia solani*, *Rosellinia necatrix*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotium sclerotiorum* e *Clitocybe tabescens* (ZENTMYER, 1976; DARVAS, 1978; PÉREZ-JIMÉNEZ, 2008).

1.2.2 *Phytophthora cinnamomi* Rands

Phytophthora cinnamomi Rands (1922) é um patógeno cosmopolita e tem sido isolado de mais de 700 espécies vegetais, especialmente das lenhosas, causando a doença conhecida comumente como podridão radicular (FARR; ROSSMAN, 2015) em diversos países do mundo, entre eles no Brasil (Figura 2).

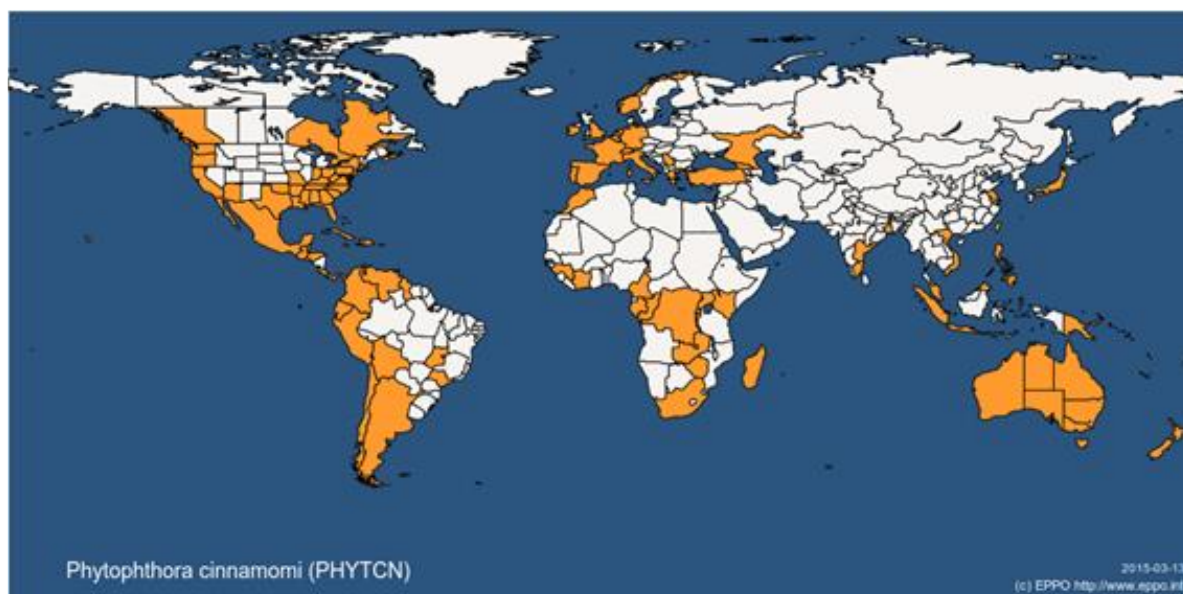


Figura 2. Distribuição atual de *Phytophthora cinnamomi* no mundo. Fonte: EPPO, 2015.

O ciclo biológico de *Phytophthora cinnamomi* é complexo e consiste de diversos mecanismos que favorecem sua disseminação e persistência (Figura 3) sendo determinado por fatores como, presença de água livre no solo, oxigênio, hospedeiros e dos dois tipos sexuais compatíveis (A1 e A2) para seu cruzamento genético (LINDE et al., 1997; COLLINS et al., 2012; MARTIN et al., 2012; CRONE et al., 2013), sendo estes tipos sexuais reportados no Brasil (SANTOS et al., 2014).

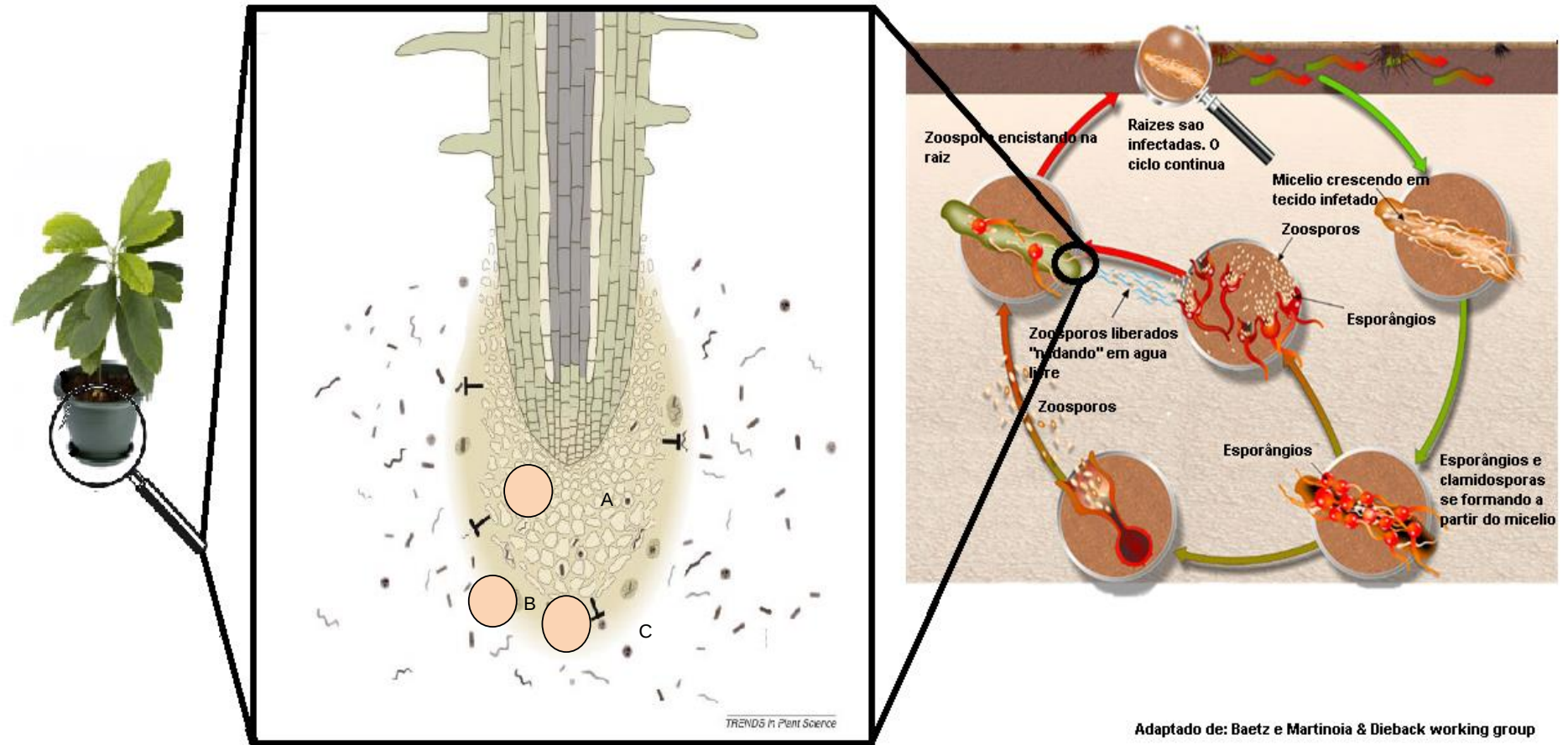


Figura 3. Ciclo biológico de *Phytophthora cinnamomi* entre o substrato e o tecido radicular, detalhando a participação da raiz, na atração inicial dos zoósporos (A) participação da matriz da mucilagem na defesa da planta (B) e liberação de metabolitos que participam no controle do patógeno (C) e fases subsequentes entre as raízes e rizosfera das plantas. Fonte: Adaptado de Baetz e Martinola & Dieback working group.

A podridão radicular causada por *Phytophthora cinnamomi* segue sendo a principal limitação na abacaticultura comercial e sua disseminação tem sido referenciada em mais de 147 países, entre eles no Brasil (PLOETZ, 2013; EPPO, 2015).

No Brasil, como em outros países produtores de abacate, as condições agroclimáticas são favoráveis para o desenvolvimento da cultura, mas também para a disseminação do patógeno, o que, associado a práticas inadequadas de estabelecimento e manejo da cultura, incidem no aumento da disseminação não só em plantios comerciais (SAVITA; AVINASH, 2012; SANTOS et al., 2014), mas também em ecossistemas naturais (DOS SANTOS et al., 2011).

Os programas de seleção e melhoramento, assim como o critério de seleção de porta-enxertos em termos de sanidade, têm sido focados principalmente na expressão e estabilidade da resistência dos porta-enxertos a *Phytophthora cinnamomi* (CRANE et al., 2013).

1.2.3 Porta-enxertos ‘Duke 7’ e ‘Toro canyon’

Entre os materiais tolerantes à *Phytophthora cinnamomi* mais utilizados a nível mundial como porta-enxertos, tem-se: Thomas, Toro canyon (Figura 4a, b, c), Duke 7 (Figura 4d, e, f), G22 e G55 (MENGE et al., 2012). Entre a década de 40 e 50, na procura por fontes de resistência, foram selecionados dentre a cultivar Duke, ‘Duke 6’ e o ‘Duke 7’ como tolerantes à *P. cinnamomi*. Nas condições da Califórnia, ‘Duke 7’ tem sido amplamente difundido nas regiões produtoras de abacate, no entanto, não é o porta-enxerto mais utilizado no México, maior exportador mundial desta fruta, devido ao uso de materiais nativos propagados por semente (FERNÁNDEZ-PAVÍA; DÍAZ-CELAYA; RODRÍGUEZ-ALVARADO, 2013).

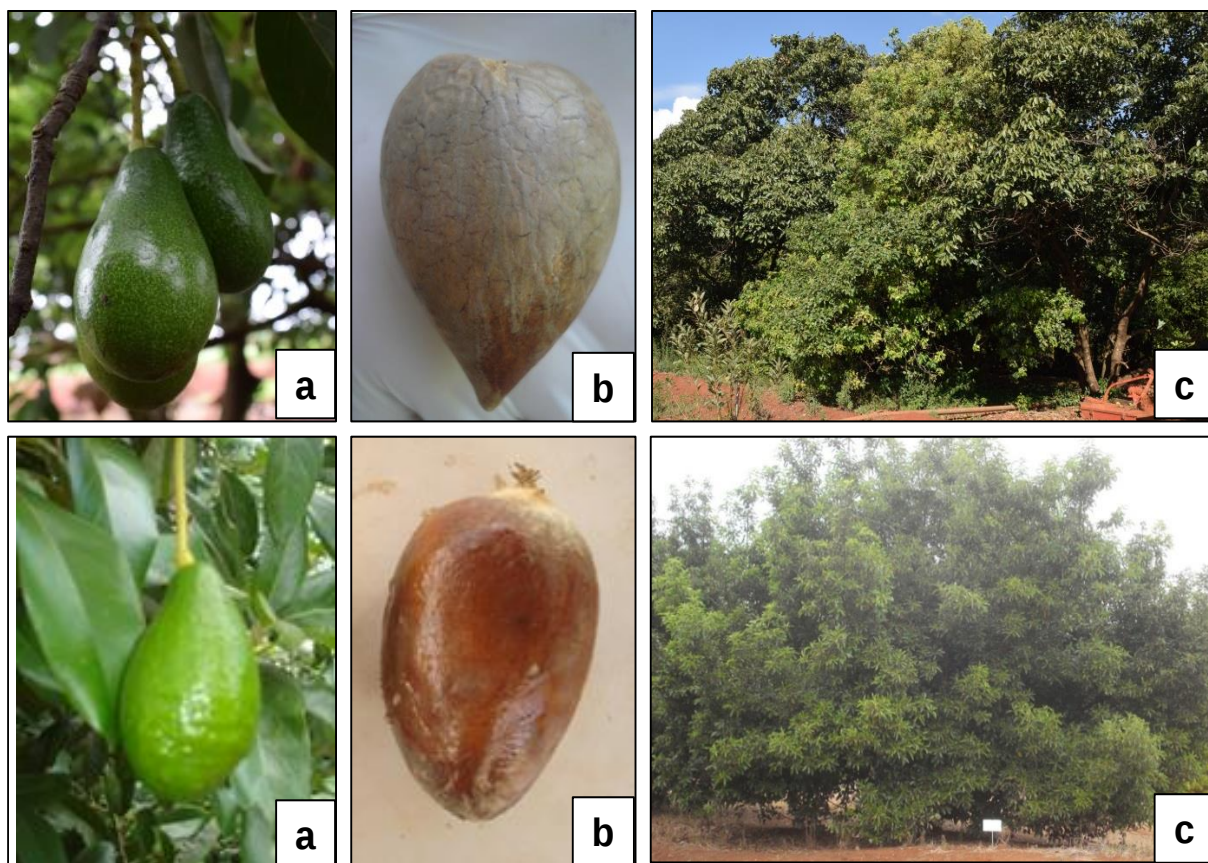


Figura 4. Fruto (a) semente (b) e planta adulta (c) dos materiais de abacateiro 'Toro canyon' (superior) e 'Duke 7' (inferior).

Além da tolerância do 'Duke 7' a *Phytophthora cinnamomi*, o material adapta-se às condições ambientais das principais regiões produtoras no mundo e é compatível com a cultivar Hass (WHILEY; SCHAFFER; WOLSTENHOLME, 2002), cuja importância foi referida anteriormente. No entanto, Andrade et al. (2012), observaram que em ambiente sob 17 °C, os porta-enxertos Teplec, D7 e Thomas tiveram 20, 50 e 51% de plântulas afetadas por *P. cinnamomi*.

O porta-enxerto Toro canyon, da raça mexicana, foi originalmente selecionado pela sua sobrevivência em uma área sob incidência de *Phytophthora cinnamomi* (STAUFFER, 1986), porém, quando avaliado na fase de muda como porta-enxerto foi considerado em tolerância intermediária (GABOR, 1991). Sob outras condições de produção, o 'Toro canyon' tem sido referido também como adaptável a solos salinos e com presença de *Phytophthora citrícola* (MICKELBART; ARPAIA, 2002).

1.2.4 Ferramentas biotecnológicas na superação das limitações para produção de abacate

Associado ao desenvolvimento de técnicas *in vitro* para multiplicação e transformação genética, referidos anteriormente, outras ferramentas das chamadas “omicas” vem auxiliando no entendimento de problemas fitossanitários, entre eles, o causado por *P. cinnamomi*.

No estudo do secretoma do patossistema planta - *Phytophthora sp.*, sabe-se, por exemplo, que o patógeno utiliza metabólitos de reconhecimento e fixação ao hospedeiro numa primeira fase (HARDHAM, 2001) e posteriormente de infecção e degradação dos tecidos, dependendo do nível de tolerância do hospedeiro, assim como do comportamento do patógeno (necrotrófico/hemibiotrófico) (OSWALD et al., 2014).

Nessa interação planta-patógeno, produto da coevolução, vários são os mecanismos envolvidos, que refletem em níveis diferentes de tolerância ou susceptibilidade, muitos deles usando como elicitores as proteínas chamadas PR (*Pathogen related*, por suas siglas em inglês) relacionadas com patogênese (FERREIRA et al., 2007). Aproveitando-se destes mecanismos, modelos para o silenciamento de RNA's no intuito de obter de porta-enxertos tolerantes, vêm sendo testados (MITTER, 2012).

Por sua vez, usando ferramentas de proteômica em abacateiro tem se identificado de modo preliminar proteínas associadas com a tolerância de porta-enxertos a *Phytophthora cinnamomi* (ACOSTA-MUÑIZ et al., 2012) e com a regeneração de embriões somáticos (GUZMÁN-GARCÍA et al., 2013).

Diante do anteriormente exposto, os testes relacionados neste trabalho objetivaram se aproximar da resposta da pergunta: A progênie de matrizes de abacateiro tolerantes a *Phytophthora cinnamomi* mantém a tolerância dos parentais. Além disso visaram abordar aspectos relacionados à introdução *in vitro* de explantes dos materiais Duke 7 e Toro canyon.

1.3 Referências

ACOSTA-MUÑIZ, C. H.; ESCOBAR-TOVAR, L.; FERNÁNDEZ-PAVIA, S.; ARIA-SAUCEDO, L. J.; BARQUERA, M. C. E.; LIM, M. A. Identification of avocado (*Persea americana*) root proteins induced by infection with the oomycete *Phytophthora cinnamomi* using a proteomic approach. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 144, n. 1, p. 59–72, 2012.

ANDRADE, H. P.; LÉON, C.; ESPÍNDOLA, B. M. C.; ALVARADO, R. D.; LÓPEZ, J. A. Selection of avocado rootstocks for tolerance-resistance to *Phytophthora cinnamomi* Rands. using controlled temperature. **Spanish Journal of Rural Development**, Lugo, v. 3, n. 4, p. 23–30, 2012.

ASHWORTH, V. E.; CLEQQ, M. T. Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): genealogical relationships among cultivated avocado genotypes. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 94, n. 5, p. 407–415, 2003.

AVENIDO, R. A.; PATENA, L. F.; DIMACULANGAN, J. G.; WELGAS, J. N.; BARBA, R. C. Complete micropropagation system of avocado, from somatic embryogenesis to successful transplant to soil, and its application to mutation breeding. In: Scientific Conference, Development Academy of the Philippines. **Anais...** 2007. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=PH2008001422>>. Acesso em: 18 jun. 2015.

BAETZ, U.; MARTINOIA, E. Root exudates: the hidden part of plant defense. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 19, n. 2, p. 90–8, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2013.11.006>>.

BARCELO-MUÑOZ, A.; ENCINA, C. L.; SIMÓN-PÉREZ, E.; PLIEGO-ALFARO, F. Micropropagation of adult avocado. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 58, n. 1, p. 11–17, 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1023/A:1006305716426>>.

BIASI, L. A. Fitotoxicidade de três antibióticos na cultura *in vitro* de abacateiro. **Bragantia**, Campinas, v. 54, n. 2, p. 251–256, 1995. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87051995000200003>>.

CARVALHO, A. C. P. P.; RODRIGUES, A. A. J.; SANTOS, E. O. **Panorama da produção de mudas micropropagadas no Brasil**. Fortaleza: Embrapa: Agroindústria Tropical, 2012. 42 p. (Documentos, 157).

CASWELL, H.; SALGUERO-GÓMEZ, R. Age, stage and senescence in plants. **Journal of Ecology**, Chichester v. 101, n. 3, p. 585–595, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111%2F1365-2745.12088>>.

COLLINS, S.; McCOMB, J. A.; HOWARD, K.; SHEARER, B. L.; COLQUHOUN, I. J.; HARDY, G. E. St. J. The long-term survival of *Phytophthora cinnamomi* in mature *Banksia grandis* killed by the pathogen. **Forest Pathology**, Berlin, v. 42, n. 1, p. 28–36, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0329.2011.00718.x>>.

COOK, R. E. Clonal plant populations: a knowledge of clonal structure can affect the interpretation of data in a broad range of ecological and evolutionary studies. **American Scientist**, Durham, v. 71, n. 3, p. 244–253, 1983.

CRANE, J. H.; DOUHAN, G.; FABER, B. A.; ARPAIA, M. L.; BENDER, G. S., BALERDI, C. F.; BARRIENTOS-PRIEGO, A. F. Cultivars and rootstocks. In: SCHAFFER, B., WOLSTENHOLME, B. N., WHILEY, A. W. (Eds.). **The avocado: botany, production and uses**. Wallingford: CABI, 2013. p. 200–233. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1079/9781845937010.0000>>.

CRONE, M.; McCOMB, J. A.; O'BRIEN, P. A.; HARDY, G. E. Survival of *Phytophthora cinnamomi* as oospores, stromata, and thick-walled chlamydospores in roots of symptomatic and asymptomatic annual and herbaceous perennial plant species. **Fungal Biology**, London, v. 117, n. 2, p. 112–123, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2012.12.004>>.

DABAS, D.; ELIAS, R. J.; LAMBERT, J. D.; ZIEGLER, G. R. A colored avocado seed extract as a potential natural colorant. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 76, n. 9, p. 1335–1341, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02415.x>>.

DARVAS, J. M. Common root pathogens from avocados. **South African Avocado Growers' Association Research Report**, Limpopo, v. 2, p. 3–4, 1978.

DORANTES, L.; PARADA, L.; ORTIZ, A. **Avocado: post-harvest operations**. Rome: AGST/FAO, 2004.

DORIZZOTTO, C. D. A.; SAMPAIO, A. C.; ICUMA, I. M.; YAMANISHI, O. K. Avocado production chain in the state of São Paulo (Brazil). In: WORLD AVOCADO CONGRESS, 7., 2011, Cairns. **Anais...** Cairns: Avocados Australia, 2011. CD-ROM.

DOUHAN, G. W. Current and future perspectives regarding avocado rootstock breeding at UCR. **California Avocado Society – Yearbook**, Temecula, v. 92, p. 87–111, 2009.

DOUHAN, G. W.; McKEE, B.; POND, E. Screening and Evaluation of New Rootstocks with Resistance to *Phytophthora cinnamomi* 2005 – Continuing project : year 15 of 20. In: CALIFORNIA AVOCADO RESEARCH SYMPOSIUM, 2006, Riverside. **Anais...** Riverside: California Avocado Commission, 2006. p. 81–86.

ENCINA, C. L.; PARISI, A.; O'BRIEN, C.; MITTER, N. Enhancing somatic embryogenesis in avocado (*Persea americana* Mill.) using a two-step culture system and including glutamine in the culture medium. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 165, p.44–50, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2013.10.019>>.

EPPO. **EPPO Global Database**. (s.d.). Disponível em: <<https://gd.eppo.int>>.

ERNST, A. A. Maluma Hass® : a new released cultivar in comparison with Hass. VI World Avocado Congress. In: WORLD AVOCADO CONGRESS, 6., 2007, Viña Del Mar, Chile. **Anais...** Viña Del Mar: ACTAS, 2007. CD-ROM.

ERNST, A. A.; WHILEY, A. W.; BENDER, G. S. Propagation. In: SCHAFFER, B.; WOLSTENHOLME, B. N.; WHILEY, A. W. (Eds.). **The avocado: botany, production and uses**. 3rd d. Wallingford: CABI, 2013. p. 234–267.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Statistics division**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>>. Acesso em: 12 out. 2015.

FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. **Fungal databases, systematic mycology and microbiology laboratory**. Disponível em: <<http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>>. Acesso em: 25 abr. 2015.

FASSIO, C.; HEATH, R.; ARPAIA, M. L.; CASTRO, M. Sap flow in “Hass” avocado trees on two clonal rootstocks in relation to xylem anatomy. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 120, n. 1, p. 8–13, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2008.09.012>>.

FERNÁNDEZ-PAVÍA, S. P.; DÍAZ-CELAYA, M.; RODRÍGUEZ-ALVARADO, G. *Phytophthora* in México. In: KURT, L. (Ed.). **Phytophthora: a global perspective**. Wallingford: CABI, 2013. p. 215–221.

FERREIRA, R. B.; MONTEIRO, S.; FREITAS, R.; SANTOS, C. N.; CHEN, Z.; BATISTA, L. M.; DUARTE, J.; BORGES, A.; TEIXEIRA, A. R. The role of plant defense proteins in fungal pathogenesis. **Molecular Plant Pathology**, Chichester, v. 8, n. 5, p.677–700, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00419.x>>.

FROLICH, E. F. Rooting Guatemalan avocado cuttings. **California Avocado Society. Yearbook**, Temecula, v. 36, p. 136–138, 1951.

FUENTES, J. L.; RODRÍGUEZ, N. N.; SANTIAGO, L.; VALDÉS, Y.; RAMÍREZ, I. M.; RODRÍGUEZ, J. A. Zygotic embryo culture in avocado (*Persea americana* Mill.). **Cultivos Tropicales**, San Jose de las Lajas, v. 25, n. 3, p. 73–76, 2013.

GABOR, B. K. Comparison of rapid methods for evaluating resistance to *Phytophthora cinnamomi* in Avocado Rootstocks. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 75, n. 2, p. 118, 1991.

GEISSMAN, T. A.; DITTMAR, H. F. K. A proanthocyanidin from avocado seed. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 4, n. 3, p. 359–368, 1965.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. Plant tissue culture procedure – background. In: _____ (Eds.). **Plant propagation by tissue culture**. 3. ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 2008. p. 1–28.

GOLDSCHMIDT, E. E. Plant grafting: new mechanisms, evolutionary implications. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, p. 1–9, 2014.

GUZMÁN-GARCÍA, E., SÁNCHEZ-ROMERO, C.; PANIS, B.; CARPENTIER, S. C. The use of 2D-DIGE to understand the regeneration of somatic embryos in avocado. **Proteomics**, Weinheim, v. 13, n. 23–24, p. 3498–3507, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201300148>>.

HARDHAM, A. R. The cell biology behind *Phytophthora* pathogenicity. **Australasian Plant Pathology**, Dordrecht, v. 30, n. 2, p. 91–98, 2001.

HOFFMANN, R. Estimativas das elasticidades-renda de várias categorias de despesa e de consumo, especialmente alimentos, no Brasil, com base na POF de 2008–2009. **Revista de Economia Agrícola**, São Paulo, v. 57, n. 2, p. 49–62, 2010.

IDRIS, S.; NDUKWE, G.; GIMBA, C. Preliminary phytochemical screening and antimicrobial activity of seed extracts of *Persea americana* (avocado pear). **Bayero Journal of Pure and Applied Sciences**, Ankara, v. 2, n. 1, p. 173–176, 2010.

INCH, S. A.; PLOETZ, R. C. Impact of laurel wilt, caused by *Raffaelea lauricola*, on xylem function in avocado, *Persea americana*. **Forest Pathology**, Berlin, v. 42, n. 3, p. 239–245, 2012.

JAIN, S. M.; ISHII, K. **Micropropagation of woody trees and fruits**. 2nd ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012. 840 p.

LEE, E. A.; ANGKA, L.; ROTA, S. G.; HANLON, T.; HURREN, R.; WANG, X. M.; GRONDA, M.; BERNARD, D.; MINDEN, M. D.; MITCHELL, A.; EDGINTON, A.; SRISKANTHADEVAN, S.; DATTI, A.; WRANA, J.; JOSEPH, J. W.; QUADRILATERO, J.; SCHIMMER, A. D.; SPAGNUOLO, P. A. Inhibition of fatty acid oxidation with avocatin B selectively targets aml cells and leukemia stem cells. **Blood**, Washington, v. 124, n. 21, p. 268, 2014.

LEE, E. A.; ANGKA, L.; ROTA, S. G.; HANLON, T.; MITCHELL, A.; HURREN, R.; WANG, X. M.; GRONDA, M.; BOYACI, E.; BOJKO, B.; MINDEN, M.; SRISKANTHADEVAN, S.; DATTI, A.; WRANA, J. L.; EDGINTON, A.; PAWLISZYN, J.; JOSEPH, J. W.; QUADRILATERO, J.; SCHIMMER, A. D.; SPAGNUOLO, P. A. Targeting mitochondria with avocatin B induces selective leukemia cell death. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 75, n. 12, p. 2478–2488, 2015.

LINDE, C.; DRENTH, A.; KEMP, G. H.; WINGFIELD, M. J.; VON BROEMBSSEN, S. L. Population structure of *Phytophthora cinnamomi* in South Africa. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 8, p. 822–827, 1997.

MARTIN, F. N.; ABAD, Z. G.; BALCI, Y.; IVORS, K. Identification and detection of phytophthora: reviewing our progress, identifying our needs. **Plant Disease**, St. Paul, v. 96, n. 8, p. 1080–1103, 2012.

MENGESHA, J. A.; DOUHAN, G. W.; MCKEE, B.; POND, E.; BENDER, G. S.; FABER, B. Three new avocado rootstock cultivars tolerant to phytophthora root rot: “Zentmyer”, “Uzi”, and “Steddom”. **HortScience**, Alexandria, v. 47, n. 8, p. 1191–1194, 2012.

MICKELBART, M. V.; ARPAIA, M. L. Rootstock influences changes in ion concentrations, growth, and photosynthesis of 'hass' avocado trees in response to salinity. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 127, n. 4, p. 649–655, 2002.

MITTER, N.; PARISI, A.; MITCHELL, R.; O'BRIEN, C.; DIETZGEN, R.; BAILEY, A.; NIBLETT, C. Phytophthora resistant transgenic avocado rootstocks for non GM fruit. In: INTERNATIONAL PLANT AND ANIMAL GENOME CONFERENCE, 20., 2012, San Diego. **Anais Eletrônicos...** San Diego: PAG, 2012. Disponível em: <<https://pag.confex.com/pag/xx/webprogram/Paper2464.html>>. Acesso em: 22 jan.2016.

MOHAMED-YASSEEN, Y. Morphogenesis of Avocado *in vitro*. A Review. **California Avocado Society – Yearbook**, Temecula, v. 77, p. 101–105, 1993.

OLMOS, S.; LUCIANI, G.; GALDEANO, E. Métodos de propagación y conservación de germoplasma. In: LEVITUS, G.; ECHENIQUE, V.; RUBINSTEIN, C.; HOPP, E.; MROGINSKI, L. (Eds.). **Biotechnología y mejoramiento vegetal**. Buenos Aires: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 2004. p. 353-362.

OßWALD, W.; FLEISCHMANN, F.; RIGLING, D.; COELHO, A. C.; CRAVADOR, A.; DIEZ, J.; DALIO, R. J.; HORTA JUNG, M.; PFANZ, H.; ROBIN, C.; SIPOS, G.; SOLLA, A.; CECH, T.; CHAMBERY, A.; DIAMANDIS, S.; HANSEN, E.; JUNG, T.; ORLIKOWSKI, L. B.; PARKE, J.; PROSPERO, S.; WERRES, S. Strategies of attack and defence in woody plant–Phytophthora interactions. **Forest Pathology**, Berlin, v. 44, n. 3, p. 169–190, 2014.

PERÁN-QUESADA, R.; SÁNCHEZ-ROMERO, C.; BARCELÓ-MUÑOZ, A.; PLIEGO-ALFARO, F. Factors affecting maturation of avocado somatic embryos. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 102, n. 1, p. 61–73, 2004.

PÉREZ-JIMÉNEZ, R. M. Significant avocado diseases caused by fungi and oomycetes. **The European Journal of Plant Science Biotechnology**, Middlesex, v. 2, n. 1, p. 1–24, 2008.

PLIEGO-ALFARO, F.; BARCELÓ-MUÑOZ, A.; SIMÓN-PÉREZ, E.; VIÑA-NIETO, G.; SÁNCHEZ-ROMERO, C.; PERÁN-QUESADA, R. La micropropagación en la mejora de patrones de aguacate (*Persea americana* Mill): problemas y limitaciones. **Revista Chapingo**, Chapingo, v. 5, p. 239–244, 1999.

PLIEGO-ALFARO, F.; MURASHIGE, T. Possible rejuvenation of adult avocado by graftage onto juvenile rootstocks *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v. 22, n. 6, p. 1321–1324, 1987.

PLOETZ, R. C. Phytophthora root rot of avocado. In: LAMOUR, K. (Ed.). **Phytophthora: a global perspective**. Wallingford: CABI, 2013. v. 2, p. 197.

RAHARJO, S. H. T.; LITZ, R. E. Micrografting and ex vitro grafting for somatic embryo rescue and plant recovery in avocado (*Persea americana*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 82, n. 1, p. 1–9, 2005.

SÁNCHEZ-ROMERO, C.; PERÁN-QUESADA, R., MÁRQUEZ-MARTÍN, B.; BARCELÓ-MUÑOZA, A.; PLIEGO-ALFARO, F. *In vitro* rescue of immature avocado (*Persea americana* Mill.) embryos. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 111, n. 4, p. 365–370, 2007.

SANTOS, Á. F. dos.; TESSAMANN, D. J.; ALVES, T. C. A.; VIDA, J. B.; ARAKAVA, R. Root and crown rot of brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) caused by *Phytophthora cinnamomi*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 159, n. 3, p. 194–196, 2011.

SANTOS, M. V. O.; ARAÚJO, D. C. S.; MAGALHÃES, D. M. A.; SILVA, S. D. V. M.; PAIM, M. C. A.; LUZ, E. D. M. N. *Phytophthora cinnamomi* na rizosfera de cultivos agrícolas no sul da Bahia. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 40, n. 1, p. 92–92, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-54052014000100017>>.

SAVITA, G. S. V.; AVINASH, N. Citrus diseases caused by *Phytophthora* species. **GERF Bulletin of Biosciences**, Uttar Pradesh, v. 3, n. 1, p. 18–27, 2012.

SCHROEDER, C. A. Etiolation and avocado bud elongation *in vitro*. **California Avocado Society – Yearbook**, Temecula, v. 63, p. 86–89, 1979.

SCORA, R. W.; BERGH, B. The origins and taxonomy of avocado (*Persea americana*) mill. Lauraceae. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 275, p. 387–394, 1990. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.1990.275.47>>.

STAUFFER, R. D. **Avocado tree**. 1986. Disponível em: <<http://www.freepatentsonline.com/PP05642.html>>. Acesso em: 13 out. 2015.

UFODIKE, E.; ARAZU, V.; OCHINYABO, A. Utility of avocado pear seed (*Persea americana*), mango seed (*Magifera indica*) and bean seed coat (*Phaseolus vulgaris*) in fish production. **Journal of Aquatic Sciences**, Jos, v. 21, n. 1, p. 43–45, 2006.

VILLAFÁN VIDALES, K. B.; AYALA ORTIZ, D. A. Responsabilidad social de las empresas agrícolas y agroindustriales aguacateras de Uruapan, Michoacán, y sus implicaciones en la competitividad. **Contaduría y Administración**, Ciudad de México, v. 59, n. 4, p. 223–251, 2014.

VIÑA, G. D. L.; PLIEGO-ALFARO, F.; DRISCOLL, S. P.; MITCHELL, V. J.; PARRY, M. A.; DAVID, W.; LAWLOR, D. W. Effects of CO₂ and sugars on photosynthesis and composition of avocado leaves grown *in vitro*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Issy les Moulineaux, v. 37, n. 7–8, p. 587–595, 1999. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)80111-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0981-9428(00)80111-4)>.

VITALE, A.; AIELLO, D.; GUARNACCIA, V.; PERRONE, G.; STEA, G.; POLIZZI, G. First report of root rot caused by *Ilyonectria* (= *Neonectria*) *macrodidyma* on avocado (*Persea americana*) in Italy. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 160, n. 3, p. 156–159, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0434.2011.01869.x>>.

WEATHERBY, L.S.; SORBER, D.G. Chemical composition of avocado seed. **Industrial and Engineering Chemistry**, Washington, v.23, n.12, p.1421–1423, 1931.

WESSELS, H. *In vitro* Clonal Propagation of Avocado Rootstocks. **South African Avocado Growers' Association Yearbook**, Limpopo, v. 19, p. 59–60, 1996.

WHILEY, A. W.; SCHAFFER, B.; WOLSTENHOLME, B. N. **The avocado**: botany, production and uses. Wallingford: CABI Pub., 2002. 416 p.

WHILEY, A.; GIBLIN, F.; WHILEY, D. Preliminary results from avocado rootstock research in Australia. In: WORLD AVOCADO CONGRESS, 6., 2007, Viña Del Mar, Chile. **Anais...** Viña Del Mar: ACTAS, 2007. CD-ROM.

WOLSTENHOLME, B. N. **Avocado rootstocks**: what do we know; are we doing enough research? 2003. Disponível em: <http://www.avocado.co.za/wp-content/uploads/2015/01/Avocado_Rootstocks.pdf>. Acesso em: 22 jan. 2016.

YASIR, M.; DAS, S.; KHARYA, M.D. The phytochemical and pharmacological profile of *Persea americana* Mill. **Pharmacognosy Reviews**, Mumbai, v. 4, n. 7, p. 77–84, 2010.

ZENTMYER, G. A. Soil-borne pathogens of avocado. In: INTERNATIONAL TROPICAL FRUIT SHORT COURSE: THE AVOCADO. 1., 1976. Gainesville. **Anais...** Gainesville: Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida 1976. p. 75–82.

ZULFIQAR, B.; ABBASI, N. A.; AHMAD, T.; HAFIZ, I. A. Effect of explant sources and different concentrations of plant growth regulators on *in vitro* shoot proliferation and rooting of avocado (*Persea americana* Mill.) cv. “Fuerte”.

CAPÍTULO 2 – Índice de clorofila e eficiência quântica do fotossistema II em plântulas de *Persea americana* Miller: padronização de parâmetros para medição

RESUMO – Parâmetros fisiológicos padronizados para medição fisiológica de estresse, tais como índice de clorofila e fluorescência do fotossistema II, são essenciais para sua determinação acurada em plantas sob condições de estresse. Com o objetivo de normalizar os parâmetros para o aferimento do índice de clorofila a, b e total e de eficiência quântica do fotossistema II (F_v/F_m), ou fluorescência, indicadores fisiológicos de condições de estresse, mudas com seis meses de idade de *Persea americana* Miller cv. 'Duke 7' e 'Toro canyon', foram avaliadas sob condições de casa de vegetação. Em cada planta, o índice de clorofila no perfil planta foi medido da segunda até a décima quarta folha completamente expandida. A fluorescência foi medida na terceira, quinta, sétima e nona folhas totalmente expandida, comparando a interação entre tempo de exposição e intensidade da fonte de luz, assim como do tempo de pré-ajuste ao escuro da folha; também foi comparada entre o lado esquerdo e direito da folha. O índice de clorofila não foi diferente entre o lado esquerdo e direito, mas foi diferente entre os materiais testados, sendo observado o maior, no 'Duke 7', entre a folha nona e catorze, enquanto que, entre as folhas de 'Toro canyon' não houve diferença. Para F_v/F_m houve interação dos três fatores em ambos os materiais, sendo que o maior tempo de exposição (nove segundos), bem como menos tempo para aclimação no escuro e baixa intensidade de exposição não induziram níveis altos de fluorescência. Em ambos os materiais, a exposição a 100% da intensidade da luz, durante 7 segundos, depois da aclimação ao escuro entre 25 e 30 minutos foi a combinação mais adequada para a medição da eficiência quântica do fotossistema II.

Palavras-chave: abacateiro, fotossistema II, F_v/F_m , índice de clorofila, parâmetros fisiológicos

CHAPTER 2 – Standardizing parameters for chlorophyll index and PS II quantum efficiency assessment of *Persea americana* Miller seedlings

ABSTRACT – The standard physiological parameters for assessing stress physiology, of plants, such as chlorophyll index and photosystem II fluorescence, are essential for measuring reactions of plants to stress conditions. To help standardize the parameters for chlorophyll indices of chlorophylls a, b, and total and the fluorescence of photosystem II (Fv/Fm), which are physiological indicators of stress conditions, 6-mo-old seedlings of *Persea americana* Miller. cv. 'Duke7' and 'Toro canyon', were evaluated under shade-house conditions. For each plant, chlorophyll indices were measured from the second through the fourteenth fully expanded leaves. Fluorescence was measured in the third, fifth, seventh, and ninth fully expanded leaf, comparing both, time and intensity to exposure light source, and the time for dark pre-adjustment of the leaf; was also compared both right and left side of the leaf. Chlorophyll indices were not different between the left and right side of the leaf but were different between varieties with 'Duke 7' having the highest value from the eighth leaf, while leaves tested for 'Toro canyon' did not show a difference. For Fv/Fm, there was an interaction among the three factors in both materials, previously mentioned. The longest exposure time (nine seconds) as well as the shortest time for acclimation to darkness, and lowest exposure intensity did not induce maximum fluorescence levels. On both avocado cultivars, exposure to maximum light intensity for 7 seconds, and 25 to 30 minutes of acclimation to darkness, was the most favorable combination allowing the measurement of photosynthetic efficiency.

Keywords: Avocado, Fv/Fm, photosystem II, chlorophyll index, physiological parameters

2.1 Introdução

O abacateiro (*Persea americana* Miller) é uma planta C3 (WENG; LAI, 2005), nativa de regiões tropicais e subtropicais. Apresenta folhas dispostas em espiral quando se encontra em estágio de plântula, com diferenças de características foliares, como a presença de pubescência, espessura das folhas e concentração de clorofila, sendo estas características importantes que refletem na eficiência da captação de luz e na fotossíntese (MANDEMAKER, 2008).

Três variedades botânicas de abacateiro são reconhecidas, sendo elas: americana Miller (West Indian); guatemalense (guatemalense) e mexicana (*drymifolia*) (SCORA; BERGH, 1990; ASHWORTH; CLEQQ, 2003), com diferenças associadas às estratégias de aclimação aos fatores bióticos e abióticos que afetam a planta (ASHWORTH; CLEQQ, 2003) sendo estas variações genéticas associadas com características tais como altura, teor de clorofila entre outros (SCHAFFER; WHILEY, 2003).

Dentre os fatores bióticos, patógenos como *Rosellinia necatrix* Prillieux, *Rafaellea lauricola* T.C. Harr., e *Phytophthora cinnamomi* Rands, causam doenças potencialmente limitantes; sendo este último, o oomicete mais devastador da cultura comercial de abacateiro (GEORGE, 1956; GABOR, 1991; DOUHAN et al., 2011). Além disso, fatores abióticos como salinidade, hipóxia radicular, temperaturas extremas e outros podem afetar a abacaticultura (OYARCE; GUROVICH, 2010; SCHAFFER et al., 2013).

Dos anteriores, a raça mexicana é considerada a mais tolerante a baixas temperaturas, enquanto que a Antilhana e a Guatemalense são mais tolerantes a *Phytophthora cinnamomi* (DOUHAN et al., 2011; PLOETZ, 2013). Dos materiais usados como porta-enxerto, 'Topa-topa' e 'Dusa' são suscetíveis a *Rosellinia*, mas o primeiro é considerado altamente tolerante a *P. cinnamomi* (MARTÍNEZ-FERRI et al., 2016). Por sua vez, 'Duke 7', um híbrido obtido a partir da raça mexicana, e 'Toro canyon', híbrido mexicano x americana, são materiais amplamente utilizados como porta-enxertos (CRANE et al., 2013).

Variações fisiológicas, tais como o estresse oxidativo em diferentes graus, causadas por fatores bióticos e abióticos envolvem respostas de sinalização e

expressão gênica, que afetam a eficiência fotossintética. Em particular, as condições de estresse biótico e abiótico limitam o metabolismo fotossintético e mesmo a irradiância moderada pode resultar em reações foto-oxidativas (PAPAGEORGIOU, 2004; PAPAGEORGIOU; TSIMILLI-MICHAEL; STAMATAKIS, 2007; BJÖRN et al., 2009).

Para medição das características fisiológicas previamente referidas causadas pelo estresse, ferramentas *in situ* podem ser utilizadas (OYARCE; GUROVICH, 2010; ASHRAF; HARRIS, 2013; SARWAT; AHMAD; ABDIN, 2013) bem como para determinar as respostas iniciais que podem servir na detecção precoce de doenças (MARTÍNEZ-FERRI et al., 2016). Entre elas, a eficiência quântica do fotossistema II (FS II) ou fluorescência e o índice de clorofila são os parâmetros *in situ* mais comuns de avaliação não destrutiva (BAKER, 2008).

A fluorescência pode ser avaliada por indução com luz modulada ou contínua, constituindo o melhor reflexo da eficiência quântica do FS II, além de ser facilmente aclimatável a condições *in situ* (MORENO; VELA; ALVAREZ, 2008). A relação F_v/F_m entre a fluorescência variável (F_v) e a fluorescência máxima (F_m) é considerada como uma característica importante na determinação da eficiência quântica do FS II através da taxa de transporte de elétrons (MORENO; VELA; ALVAREZ, 2008; ASHRAF; HARRIS, 2013).

O valor de F_v/F_m depende de fatores tais como tempo de aclimação ao escuro da folha, a intensidade e a duração da exposição à luz (HALL; RAO, 1999; WENG; LAI, 2005; BUCHNER et al., 2013), e do conteúdo de clorofila (HALL; RAO, 1999), fatores que podem variar entre e dentro espécies e cultivares, como no caso de materiais 'Duke 7' e 'Toro canyon'.

A quantificação dos pigmentos fotossintéticos como clorofila (chl) a, b e total pode ser realizado por espectrofotometria, a partir de sua extração em solvente orgânico (KHACHIK; BEECHER; WHITTAKER, 1986) ou determinada indiretamente usando um medidor de clorofila, uma vez que ambos os métodos têm elevada percentagem de correlação (RICHARDSON; DUIGAN; BERLYN, 2002).

Por sua vez, a relação chl a/b é considerada como uma característica do tamanho da antena para captura de luz do fotossistema, sendo a relação chl a/b relativamente elevada (acima de 4) indicativa de uma antena pequena do FS II

(MATSUBARA et al., 2011), o que é característico de folhas adaptadas ao sol, enquanto que baixa proporção a/b sugere maior concentração de proteínas de colheita e maior empilhamento tilacóides, ao mesmo tempo em que em plantas sob condições de alta irradiância, o aumento da Chl a/b sugere que há diminuição na clorofila do FS II e incremento na do FS I (REED et al., 2012).

Com base no exposto, dada a falta de parâmetros de padronização para a eficiência quântica do FS II (Fv/Fm) e medição do índice de clorofila, o objetivo deste estudo foi estabelecer parâmetros para avaliação destas características *in situ* em mudas de abacateiro 'Duke 7' e 'Toro canyon'.

2.2 Material e Métodos

Da coleção de frutíferas da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal, (21°15'17"S, 48°19'20"W), mudas sadias de abacateiro (*Persea americana*) cv. 'Duke 7' e 'Toro Canyon' foram obtidas a partir de sementes de frutos de uma única árvore, de cada cultivar, de polinização aberta. As avaliações foram realizadas em maio de 2014.

As sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio (NaOCl) 1% (i.a) por 30 minutos, e aproximadamente 1 cm do ápice da semente foi removido para facilitar a germinação. Em seguida, foi realizada a semeadura em recipientes plásticos contendo dois litros de substrato comercial Plantmax™, previamente esterilizado com calor úmido, e mantidos sob condições de casa de vegetação ($53,42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $22 \pm 0.9 \text{ }^{\circ}\text{C}$) para a germinação e desenvolvimento das plântulas, as quais foram irrigadas diariamente, não havendo aplicação de fertilizantes ou pesticidas.

Para o índice de clorofila, utilizando um medidor de clorofila (Falker, mod. ClorofiLOG) foi usado o delineamento inteiramente ao acaso, estudando para cada material os efeitos simples: lado da folha e posição no perfil da plântula (Figura 5). Os valores de índice de clorofila a, b e Total são calculados pelo instrumento.

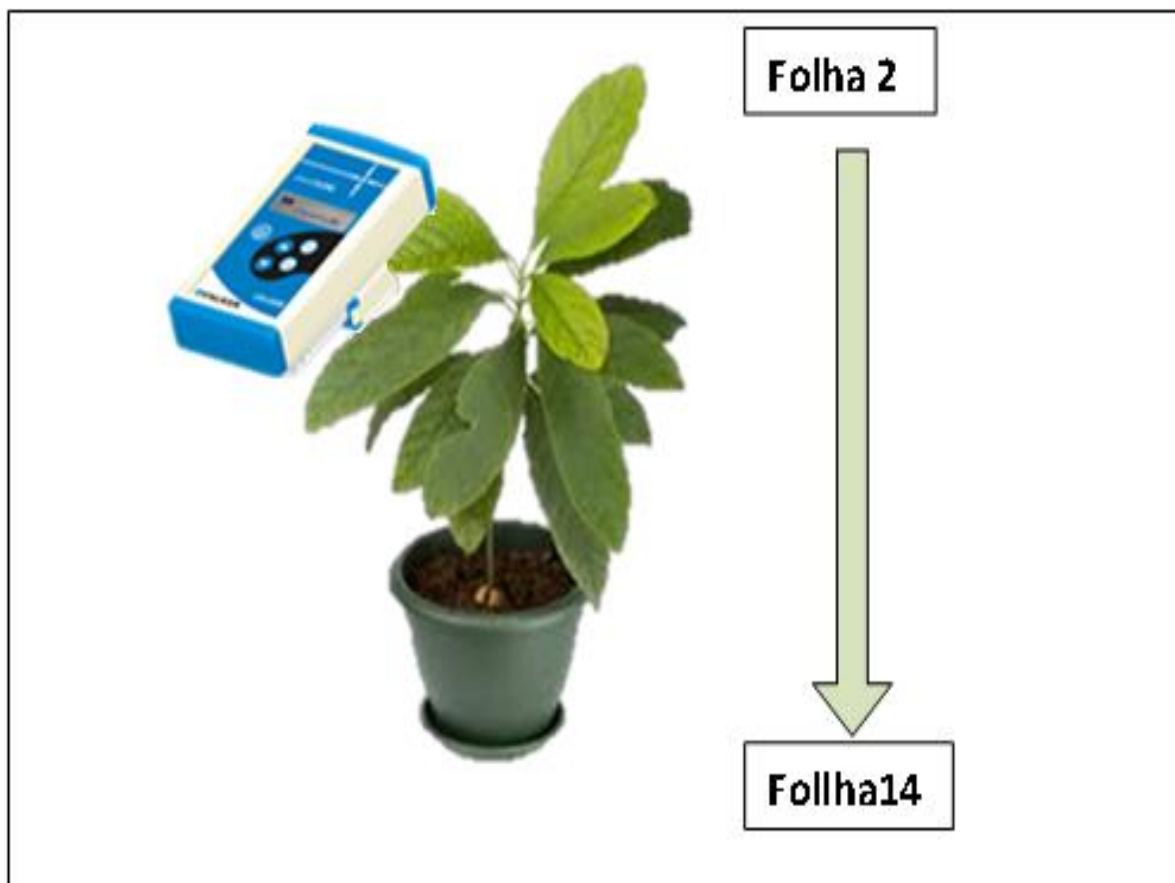


Figura 5. Diagrama para determinação dos parâmetros de avaliação do índice de clorofila em mudas de abacateiro, desde a folha dois até a folha catorze no sentido basípeto.

Para eficiência quântica do FS II (F_v/F_m), as variáveis foram analisadas em arranjo fatorial ($6 \times 6 \times 4$), sendo: 6 períodos de aclimação ao escuro (5, 10, 15, 20, 25 e 30 min); seis intensidade de luz de exposição (50, 60, 70, 80, 90 e 100%) e quatro tempos de exposição de luz (3, 5, 7 e 9 segundos). Para medir a fluorescência foi usado fluorômetro portátil (Hansatech, mod. PEA MK2), cuja unidade de sensor/iluminação fornece luz vermelha ($560 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em quatro mm^2 de área foliar (Figura 6).

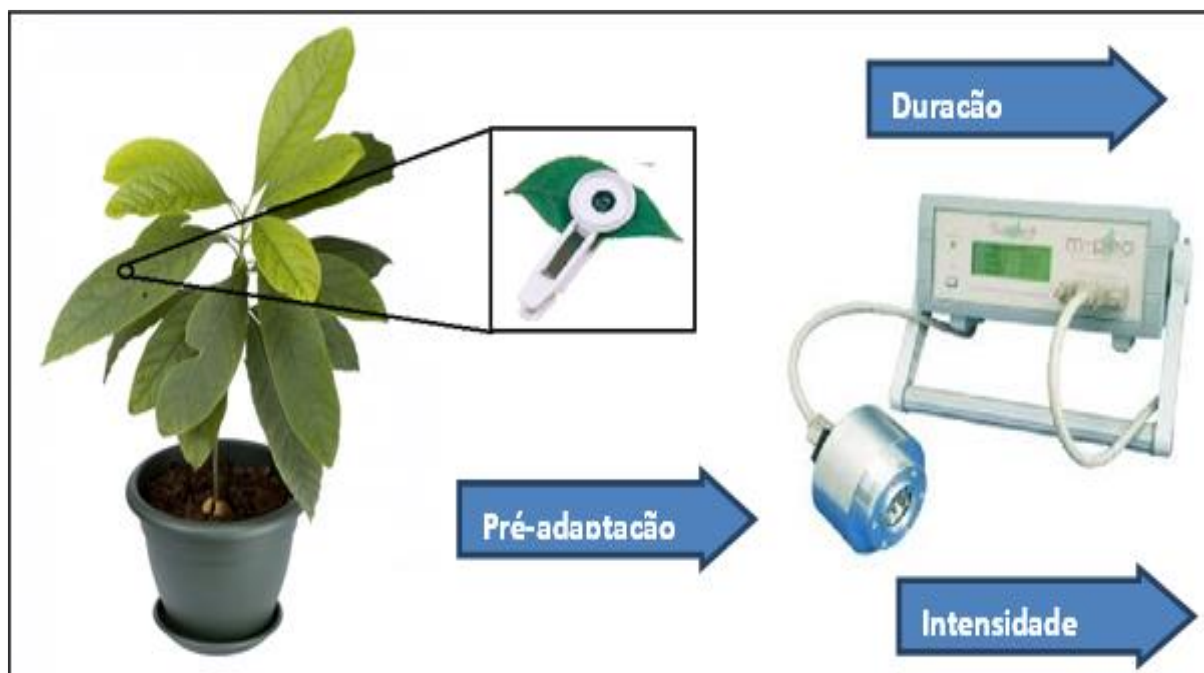


Figura 6. Diagrama para determinação dos parâmetros tanto da pré-aclimatação no escuro quanto da duração e intensidade da iluminação da área foliar para medição da fluorescência da clorofila em folhas de abacateiro.

Para determinar os valores de fluorescência foram considerados os valores de F_0 e F_m e a relação F_v/F_m , onde F_0 = fluorescência inicial, F_m = fluorescência máxima e F_v = fluorescência variável ($F_0 - F_m$) (OQUIST; WASS, 1988). Medições de F_v / F_m foram feitas no perfil da planta e também entre os lados direito e esquerdo da parte superior da sétima folha, prévio a 25 minutos de aclimação no escuro e 100% da intensidade da luz durante sete segundos de exposição.

Para a análise de imagem do espectro de cor das folhas de *P. Americana*, ambos os materiais em estudo foram comparados ('Toro Canyon' e 'Duke 7'). As folhas foram coletadas seguindo a ordem descrita na medição de clorofila, da posição superior para inferior e digitalizados usando Scanner Imagem III™. As imagens foram analisadas com o software de imagem *Image Master software 2D Platinum ver. 7.0*™, utilizando o filtro verde-azul.

Foi adotado delineamento inteiramente ao acaso, com sete repetições, sendo que em cada folha foram tomadas quatro medidas (duas de cada lado da nervura central) e com base nos valores de clorofila a e b, a razão a/b foi calculada.

A unidade experimental para cada material, 'Duke 7' e 'Toro canyon' foi

constituída de uma plântula com seis meses, sem sintomas visíveis de estresse. Para a análise estatística, as médias foram submetidas à análise de variância pelo teste F e feito análise de regressão quando significativo.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Lado e posição da folha no perfil de plântulas de 'Duke 7' e 'Toro canyon' para determinação do Índice de clorofila

Observou-se o aumento do índice de clorofila em 'Duke 7' no perfil da planta em função da maturidade da folha, sendo o maior índice de clorofila a, b e total entre as folhas 9 e 14, sem diferença entre elas (Figura 7), enquanto que no 'Toro Canyon' foi constante os índices de chl total ($p = 0,8302$), chl a ($p = 0,72$) e chl b ($p = 0,84$), sendo em média 51,1 (CV = 11,30%), 37,3 (CV = 8,65%) e 13, 8 (CV = 20,84%), respectivamente.

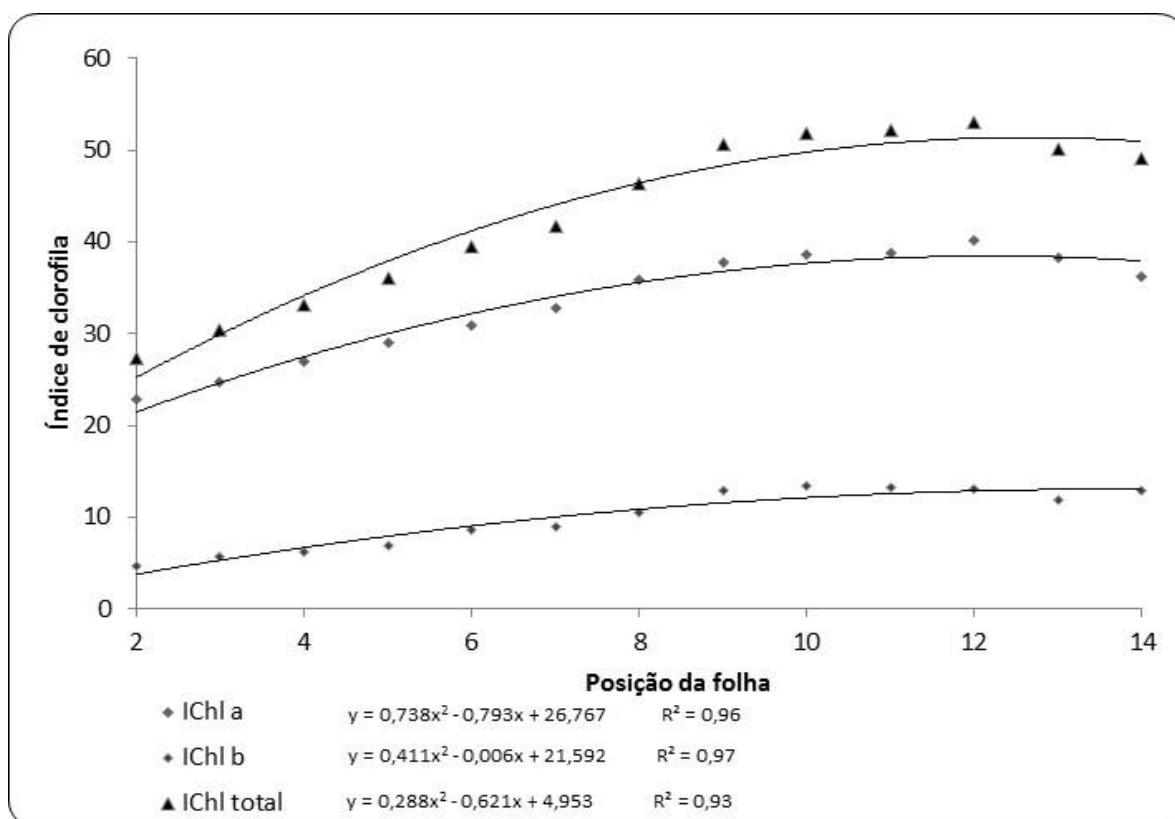


Figura 7. Análise de regressão do índice de clorofila a, b e total no perfil das plântulas de abacateiro. 'Duke 7' para determinação dos parâmetros de avaliação.

De modo similar observa-se variação no espectro de cor das folhas em função do tempo de maturidade, sendo o 'Toro canyon' mais homogêneo através do perfil, entanto que no 'Duke7' adquiriram tal característica a partir da nona folha (Figura 8).

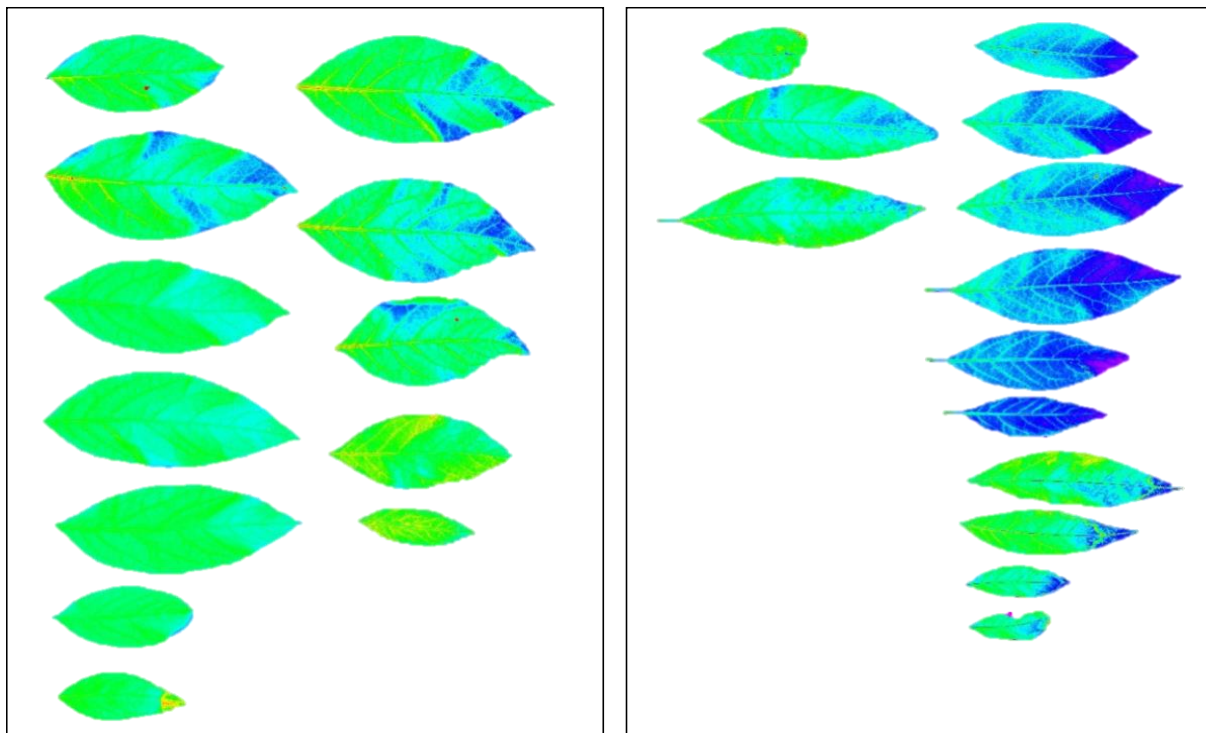


Figura 8. Espectro de cor das folhas em mudas de abacateiro var. 'Toro canyon' (esquerda) e 'Duke 7'(direita) digitalizadas com *Image Scanner III™* e analisadas com *Image Master software 2D Platinum ver. 7.0™* (Do menor para o maior, o número indica a posição da folha no sentido basípeto).

Segundo Menge et al. (2012) as diferenças, como as referidas anteriormente no perfil comparativo dos dois materiais, podem ser sinais de variação na eficiência de captura de energia associadas com a diversidade genética do abacateiro, pois as raças Americana, Guatemalense e Mexicana, diferem morfológica e fisiologicamente, devido possivelmente às condições do centro de origem. Assim, por exemplo, Guatemalense e Mexicana se caracterizam pela folhagem verde na face adaxial escura e mais clara na abaxial, claramente, como estratégia de adaptação para interceptação da luz (WOLSTENHOLME; WHILEY, 1999), enquanto que a raça Americana é caracterizada por folhagem mais clara. Particularmente, o 'Duke 7' caracteriza-se pela folhagem verde escura na face adaxial e clara na abaxial, diferente

do 'Toro Canyon' que é mais homogêneo (STAUFFER, 1986).

A determinação da diferença na cor verde entre os materiais e no perfil da planta é importante, pois permite ter noção da capacidade fotossintética, adaptação, condições de crescimento entre outras (WOLSTENHOLME; WHILEY, 1999; OUMA, 2007), sendo que as referidas estão associadas não só com o teor de clorofila, pois a pigmentação responde à interação de clorofilas, carotenóides e outros pigmentos e acessórios que variam com a idade, posição da folha, estado nutricional da planta e estresse biótico (TAIZ; ZEIGER, 2010).

Para Wolstenholme e Whiley (1999) nas folhas de abacateiro a maior concentração de clorofila (verde escuro) é funcionalmente importante desde que esta é associada com a fotoproteção do aparato fotossintético. Assim, pequenas folhas com pigmento verde homogêneo em ambas as faces, bem como entrenós curtos, típicos da raça Americana, associam-se com ambientes evolutivos menos limitados pela luz. Em folhas de tabaco, a observação descrita por Chaves (1994) sugere que o pigmento é associado também com alterações no número de estômatos e cloroplastos por unidade de área, bem como a atividade da ribulose-1, 5- difosfato-carboxilase / oxigenase (RuBisCO).

2.3.2 Parâmetro de tempo de aclimação no escuro, intensidade e tempo de exposição de luz na determinação da eficiência quântica do fotossistema II de plântulas de 'Duke 7' e 'Toro canyon'

No presente trabalho, para estimação dos referidos parâmetros, a partir da análise de variância se observa a interação significativa entre os três fatores: tempo de exposição à luz e intensidade com o tempo de aclimação ao escuro para, ambos os materiais, 'Duke 7' (Tabela 1) e 'Toro canyon' (Tabela 2) na indução de fluorescência (razão F_v/F_m); exceto para o primeiro, em que a interação da intensidade com o tempo de exposição à luz não foi significativa. Observa-se claramente a variação da eficiência quântica do fotossistema II em função da intensidade da luz, independente do tempo de exposição, e por sua vez sem diferença entre o lado direito e o esquerdo da folha, em ambos os materiais, em média de 0,737 (CV = 4,13%).

Tabela 1. Análise de variância dos efeitos principais e as interações entre intensidade luminosa, tempo de pré-aclimação no escuro e tempo de exposição à luz, na determinação dos parâmetros para medição da relação de fluorescência Fv/Fm em plântulas de abacateiro 'Duke 7'.

Fonte de variação	F
Intensidade de luz (A)	67.50**
Tempo de pré-aclimação no escuro (B)	79.25**
Tempo de exposição à luz (C)	21.45**
AxB	4.15**
AxC	1.49ns
BxC	14.11**
AxBxC	1.65**
Média geral	0.769
Erro padrão	0.014
C.V (%)	1.85

** Na coluna mostram diferença significativa pelo teste F ($p \leq 0,05$) ao nível de significância de 5% pelo teste F. NS = não significativo.

Tabela 2. Análise de variância dos efeitos principais e as interações entre intensidade luminosa, tempo de pré-aclimação no escuro e tempo de exposição à luz, na determinação dos parâmetros para medição da relação de fluorescência Fv/Fm em plântulas de abacateiro 'Toro canyon'.

Fonte de variação	F
Intensidade de luz (A)	74.07 **
Tempo de pré-aclimação no escuro (B)	63.43 **
Tempo de exposição à luz (C)	21.06 **
AxB	2.33 **
AxC	10.72 **
BxC	1.80 *
AxBxC	3.15 **
Média geral	0.783
Erro padrão	0.015
C.V (%)	1.90

** Na coluna mostram diferença significativa pelo teste F ($p \leq 0,05$) ao nível de significância de 5% pelo teste F. NS = não significativo.

Para 'Duke 7', entre 25 e 30 minutos de aclimação da folha no escuro, resultou em alta taxa de Fv/Fm, mas não no nível mais elevado, quando comparado com os outros fatores (Figura 9). Quando correlacionada com as outras variáveis, a referida relação resulta em resposta crescente. Quando utilizados entre 25 a 30 minutos de pré-aclimação, não houve diferença entre o tempo de exposição à luz.

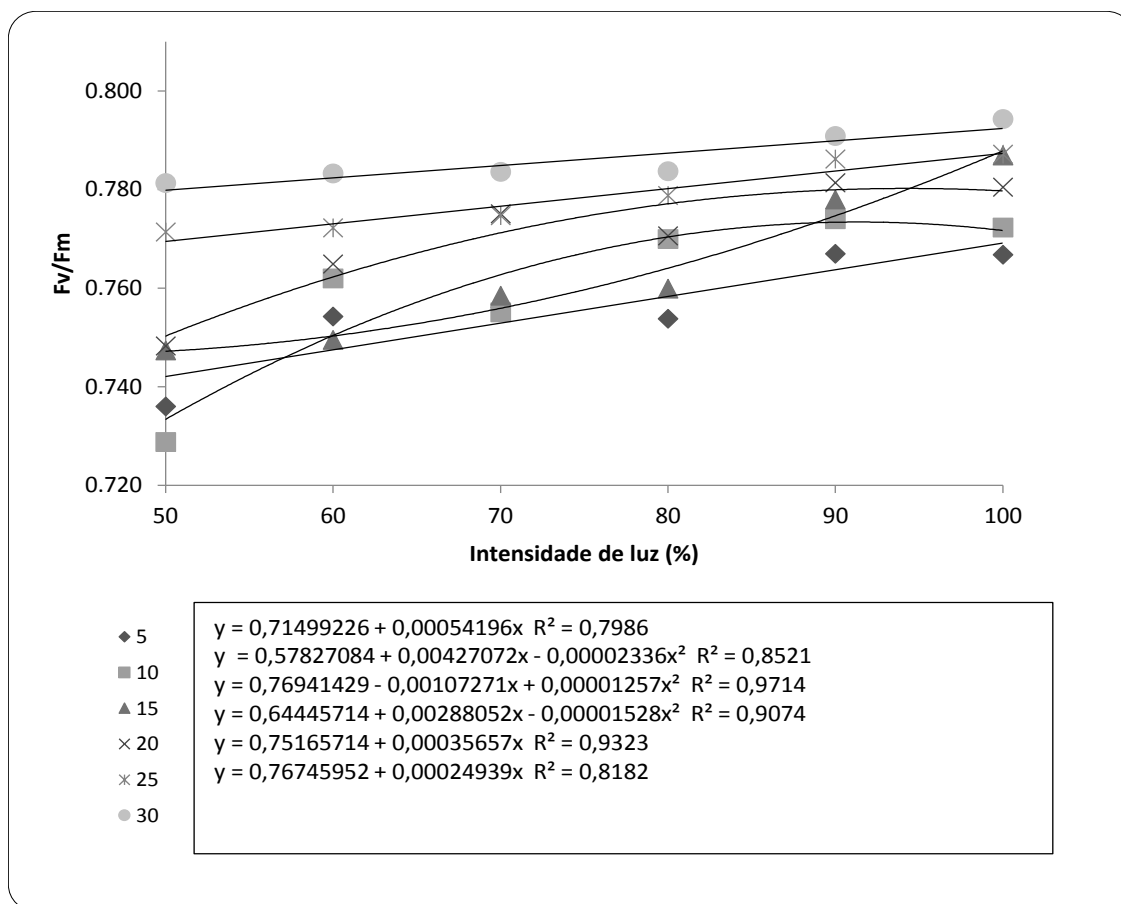


Figura 9. Análise de regressão da interação entre intensidade luminosa e tempo de pré-aclimatação no escuro na determinação dos parâmetros para medição da relação de fluorescência F_v/F_m em plântulas de abacateiro 'Duke 7'.

O aumento da intensidade da luz resultou em diferença significativa comparado com os períodos de aclimação no escuro, e, quando as folhas foram pré-aclimatadas entre 5 e 10 minutos e utilizados 60 a 100% de intensidade de luz não houve diferença estatisticamente, mas quando a pré-aclimatação foi aumentada, a taxa de F_v/F_m aumentou simultaneamente. Assim, com 30 minutos de pré-aclimatação, entre 60 e 100%, não houve diferença significativa (Figura 9).

Comparando a eficiência quântica do FS II como uma função entre o tempo de exposição e a intensidade da luz, não houve interação significativa, no entanto, quando analisado o tempo de exposição com a intensidade, entre 5 e 7 segundos com 90 ou 100%, respectivamente, obteve-se o maior valor da eficiência. Quando a intensidade da luz aumentou, esta se tornou inibitória, e consequentemente a F_v/F_m

diminuiu.

Semelhante ao observado na Figura 10, quando comparado com a interação entre o tempo de exposição à luz e pré-aclimatação no escuro da folha, a Fv/Fm aumenta como uma função desta última (Figura 10).

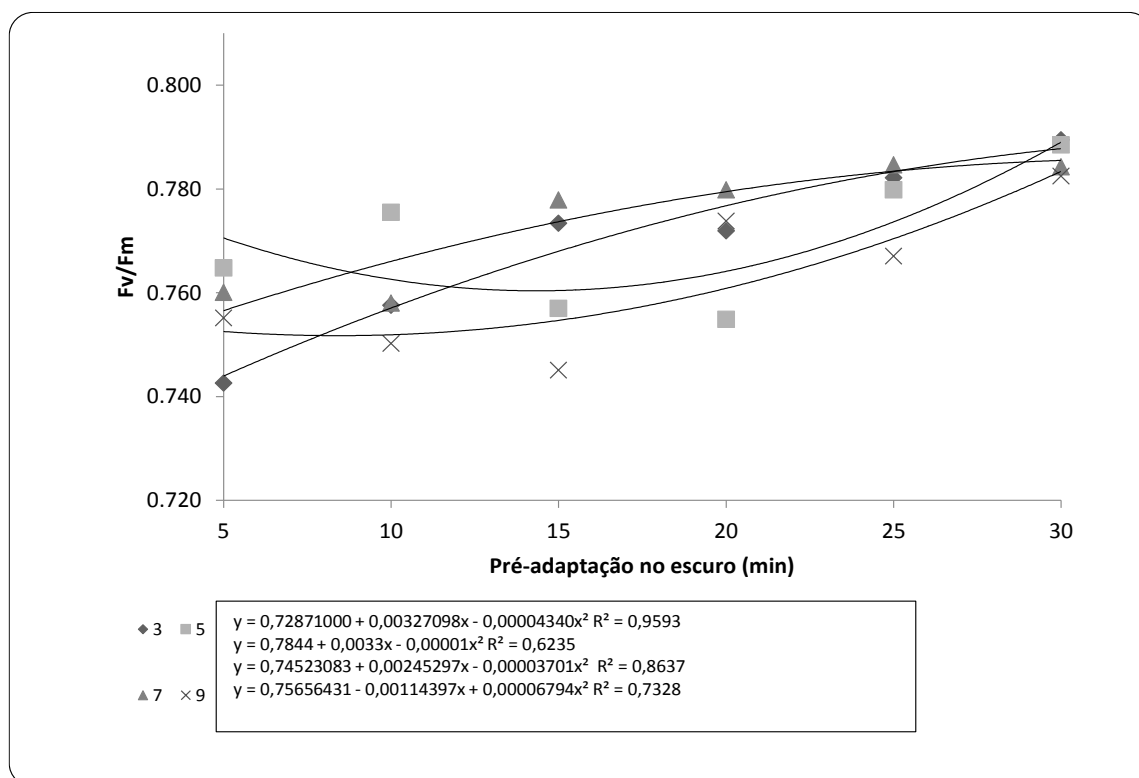


Figura 10. Análise de regressão da interação entre tempo de iluminação e tempo de pré-aclimatação no escuro na determinação dos parâmetros para medição da relação de fluorescência Fv/Fm em plântulas de abacateiro 'Duke 7'.

O tempo de exposição mais longo (9 segundos) induziu ao decréscimo na eficiência quântica do FS II nas plântulas de 'Duke 7', sugerindo que quando iluminadas prolongadamente, o fotossistema atinge a máxima saturação ou *quenching*. No entanto, baixa saturação e tempo curto de aclimação no escuro, não refletiram em valores máximos quando comparado com exposições entre 90 e 100% da irradiância.

Nas plântulas de 'Toro canyon', o menor tempo de aclimação das folhas no escuro em função da intensidade da luz limitou a estimulação de fluorescência, porém, maior tempo de aclimação induziu o aumento, ficando entre 25 e 30 minutos de

aclimação mais adequados para medir a eficiência quântica do FS II. Já em relação à intensidade da luz de 50 a 100%, independente do tempo de aclimação ao escuro, a Fv/Fm mostraram resposta linear positiva (Figura 11).

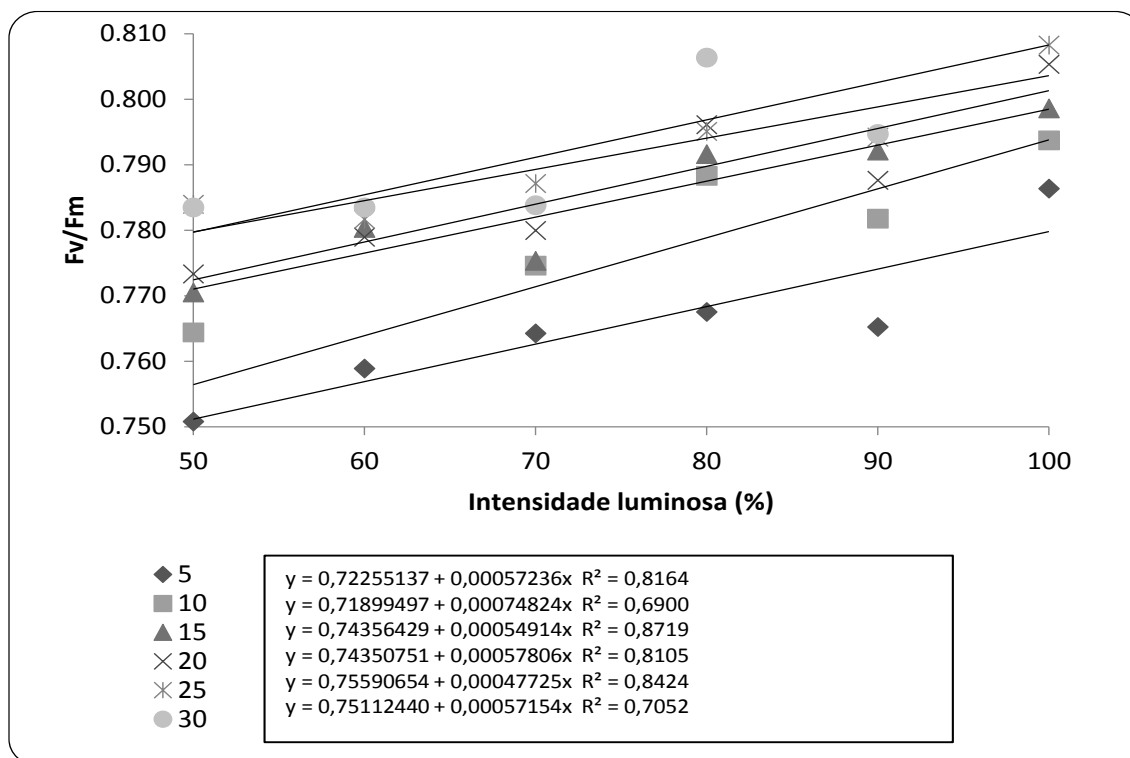


Figura 11. Análise de regressão da interação entre intensidade luminosa e tempo de pré-aclimação no escuro na determinação dos parâmetros para medição da relação de fluorescência Fv/Fm em plântulas de abacateiro 'Toro canyon'.

Para o tempo de exposição à luz, os menores tempos testados não refletiram em valores elevados de Fv/Fm, enquanto nove segundos de exposição nas maiores intensidades de luz testadas foram inibitórios. O pico máximo observou-se entre 90 e 100% de intensidade, após 7 segundos de exposição à luz (Figura 12).

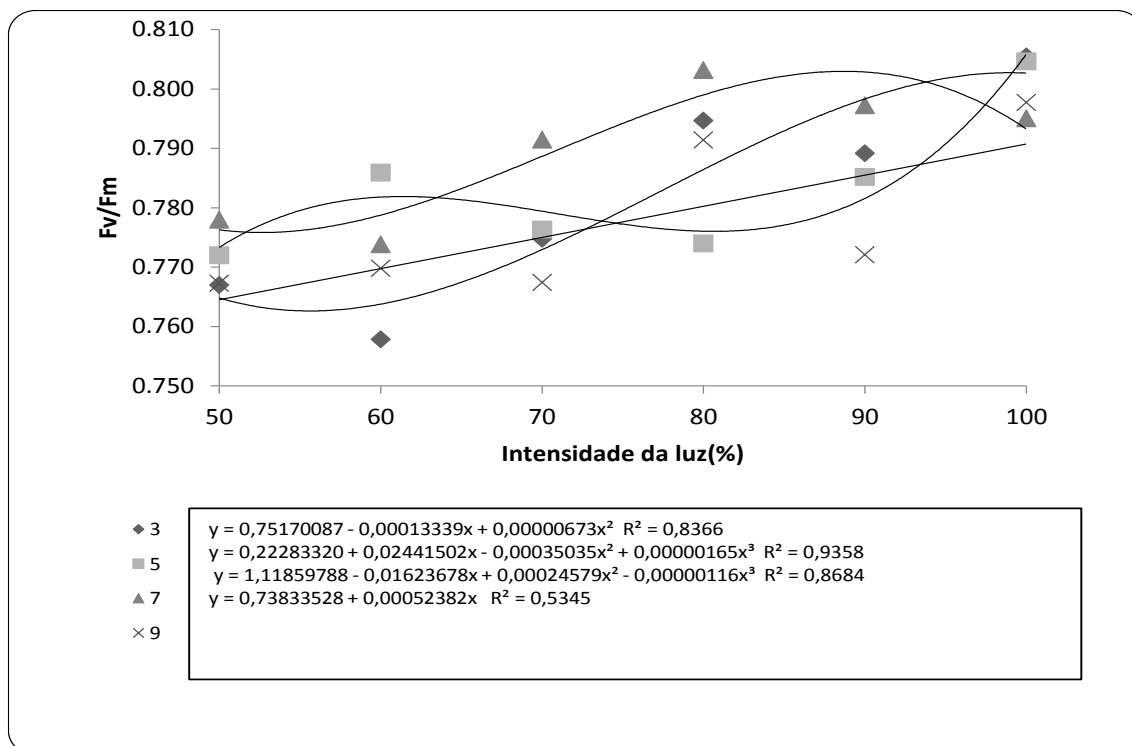


Figura 12. Análise de regressão da interação entre tempo de iluminação e a intensidade da fonte de luz na determinação dos parâmetros para medição da relação de fluorescência F_v/F_m em plântulas de abacateiro 'Toro canyon'.

A interação significativa entre o tempo de exposição à luz e aclimação no escuro das folhas mostrou que pouco tempo de aclimação ao escuro limita a mensuração eficaz e, independentemente do tempo de exposição à luz, o maior tempo de aclimação resultou em maior valor da eficiência quântica do FS II; por sua vez, a exposição entre 25 e 30 minutos, resultou nos maiores valores (Figura 13).

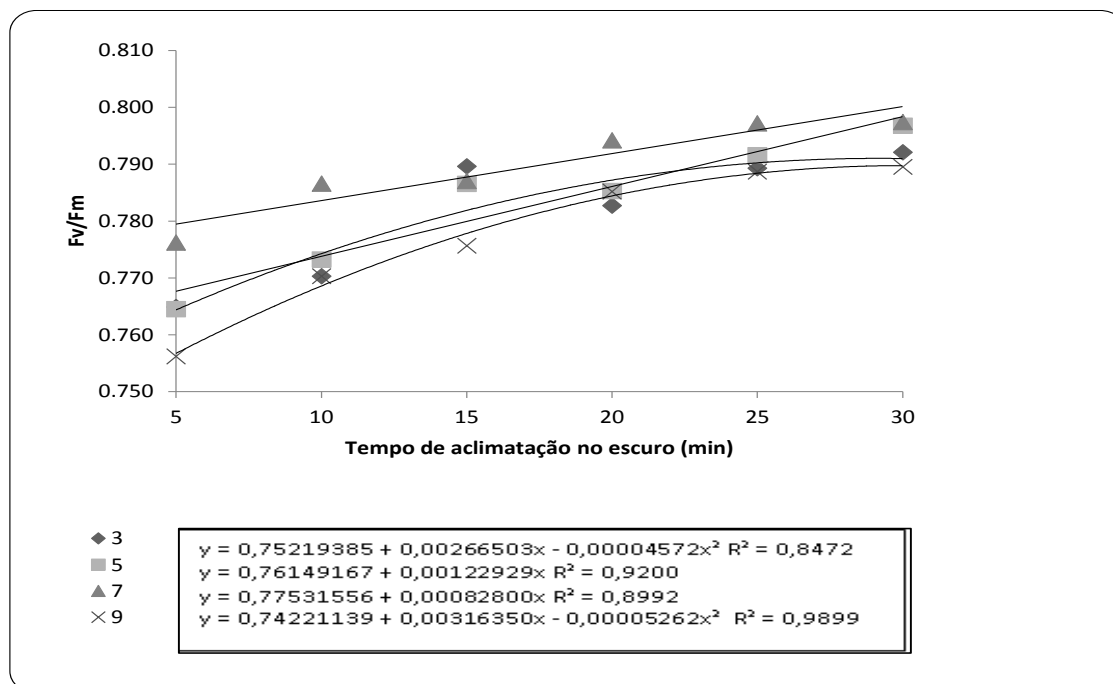


Figura 13. Análise de regressão da interação entre exposição luminosa e tempo de pré-aclimação no escuro na determinação dos parâmetros para medição da relação de fluorescência F_v/F_m em plântulas de abacateiro 'Toro canyon'.

O resultado da alta saturação de luz em folhas por períodos curtos de pré-aclimação no escuro observados anteriormente, pode ser o reflexo da rápida saturação da capacidade de transporte de elétrons do fotossistema sem ser necessariamente a máxima (F_m) do sistema, pois segundo Papageorgiou (2004) a iluminação constante com elevada intensidade de saturação induz a diminuição tanto da F_o como da F_m . Em concordância com o anterior, foi observado, tanto em 'Duke 7' como 'Toro canyon', que para cada tempo de iluminação foi atingido um valor máximo de F_v/F_m , sendo que este parâmetro foi dependente da intensidade da saturação.

Em relação ao parâmetro de aclimação para a medição direta da fluorescência, o tempo de aclimação no escuro do aparelho fotossintético, de acordo com Moreno, Vela e Alvarez (2008) permite a redução do centro da reação do fotossistema II (FS II) para estimar a resposta depois da saturação, entre 10 e 30 minutos de exposição da lamina foliar com $3000 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ por 1 a 10 segundos. Assim, no presente trabalho, foi observado para ambos os materiais, independentemente do tempo e da intensidade da luz de saturação, que entre 25 e

30 minutos de pré-aclimação houve maior Fm.

Por sua vez, de acordo com Schaffer e Whaley (2003), no estado de aclimação ao escuro ou FSII "fechado", a duração das fases da fluorescência está associada com as condições de iluminação do local, pois folhas crescendo na sombra precisam de alta irradiância para saturar todo o dossel em comparação com as que crescem sob plena exposição.

Para ambos os materiais foi o nível de exposição de 100% por 7-9 segundos depois da aclimação no escuro entre 25 e 30 minutos, que resultou nos valores máximos de Fv/Fm, o que, de acordo com Ashraf e Harris (2013) é típico em folhas saudáveis, sendo na maioria das espécies entorno de 0,800, sendo valores inferiores podem ser associados com a fotoinibição causada por algum tipo de estresse (ALVES; MAGALHÃES; BARJA, 2002; BAKER; ROSENQVIST, 2004; VAZ; SHARMA, 2011; ZLATEV, 2014).

Finalmente, com abacateiro, Ploetz e Schaffer (1987) utilizando plântulas de duas cultivares, avaliaram transpiração, condutância estomática e assimilação de CO₂, no estresse causado por *P. cinnamomi* e alagamento, medidos na quinta folha expandida, pré-aclimatada no escuro por 30 minutos, porém não se estabeleceram parâmetros específicos. Também em pomares comerciais, para determinação da fluorescência da clorofila como indicativo do estresse por temperatura, não houve descrição dos parâmetros para medição (WOLSTENHOLME; WHALEY, 1999).

2.4 Conclusões

Entre as plântulas de 'Duke 7' e 'Toro Canyon' existem diferenças em termos de índice de clorofila e eficiência quântica do FS II.

A determinação do índice de clorofila (Chl a, b e total) nas plantas de 'Duke 7' podem ser feitas a partir da nona folha; para 'Toro Canyon', não há diferença entre o perfil. Para ambos os materiais, a determinação pode ser feita tanto no lado esquerdo como direito da nervura central das folhas.

Tanto para 'Duke 7' como para 'Toro canyon', 7 segundos de exposição à luz por um período de 25 a 30 minutos é a combinação mais adequada para a medição da eficiência quântica do fotossistema II.

2.5 Referências

ALVES, P. L. C. A.; MAGALHÃES, A. C. N.; BARJA, P. R. The Phenomenon of Photoinhibition of Photosynthesis and Its Importance in Reforestation. **The Botanical Review**, New York, v. 68, n. 2, p. 193–208, 2002.

ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Photosynthesis under stressful environments: an overview. **Photosynthetica**, Prague, v. 51, n. 2, p. 163–190, 2013.

ASHWORTH, V. E.; CLEQQ, M. T. Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Miller.): genealogical relationships among cultivated avocado genotypes. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 94, n. 5, p. 407–415, 2003.

BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 89–113, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>>.

BAKER, N. R.; ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 403, p. 1607–1621, 2004.

BJÖRN, L.; PAPAGEORGIOU, G. C.; BLANKENSHIP, R.; GOVINDJE, E. A viewpoint: why chlorophyll a? **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 99, n. 2, p. 85–98, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11120-008-9395-x>>.

BUCHNER, O.; KARADAR, M.; BAUER, I.; NEUNER, G. A novel system for in situ determination of heat tolerance of plants: first results on alpine dwarf shrubs. **Plant Methods**, London, v. 9, n. 1, p. 7, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1746-4811-9-7>>.

CHAVES, M. M. Environmental constraints to photosynthesis in ex vitro plants. In: LUMSDEN, P. J.; NICHOLAS, J. R.; DAVIES, W. J. **Physiology, growth and development of plants in culture**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1994. p. 1–18. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/978-94-011-0790-7>>.

CRANE, J. H.; DOUHAN, G.; FABER, B. A.; ARPAIA, M. L.; BENDER, G. S., BALERDI, C. F.; BARRIENTOS-PRIEGO, A. F. Cultivars and rootstocks. In: SCHAFFER, B., WOLSTENHOLME, B. N., WHILEY, A. W. (Eds.). **The avocado: botany, production and uses**. Wallingford: CABI, 2013. p. 200–233. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1079/9781845937010.0000>>.

DOUHAN, G. W.; FULLER, E.; McKEE, B.; POND, E. Genetic diversity analysis of avocado (*Persea americana* Miller) rootstocks selected under greenhouse conditions for tolerance to phytophthora root rot caused by *Phytophthora cinnamomi*. **Euphytica**, Dordrecht, v. 182, n. 2, p. 209–217, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10681-011-0433-y>>.

GABOR, B. K. Comparison of Rapid Methods for Evaluating Resistance to *Phytophthora cinnamomi*, in Avocado Rootstocks. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 75, n. 2, p. 118, 1991.

GEORGE, A. Resistance of the duke variety of avocado to Phytophthora root rot. **California Avocado Society – Yearbook**, Temecula, v. 40, p. 169–173, 1956.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. Plant tissue culture procedure – background. In: _____ (Ed.). **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 2008a. p. 1–28.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. Stock plant physiological factors affecting growth and morphogenesis. In: _____ (Eds.). **Plant propagation by tissue culture**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2008b. p. 403–422.

HALL, D. O.; RAO, K. **Photosynthesis**. 6. ed. Cambridge: Press syndicate of the university of Cambridge, 1999. 248 p.

KHACHIK, F.; BEECHER, G. R.; WHITTAKER, N. F. Separation, identification, and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 34, n. 4, p. 603–616, 1986.

MANDEMAKER, A. J. Review: Photosynthesis of avocado. **New Zealand Avocado Growers Association Annual Research Report**, Wellington, v. 7, p. 11–20, 2008.

MARTÍNEZ-FERRI, E.; ZUMAQUERO, A.; ARIZA, M. T.; BARCELÓ, A.; PLIEGO, C. Nondestructive detection of white root rot disease in avocado rootstocks by leaf chlorophyll fluorescence. **Plant Disease**, St. Paul, v. 100, n. 1, p. 49–58, 2016.

MATSUBARA, S.; CHEN, Y.; CALIANDRO, R.; GOVINDJEE, G.; CLEGG, R. M. Photosystem II fluorescence lifetime imaging in avocado leaves: contributions of the lutein-epoxide and violaxanthin cycles to fluorescence quenching. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, Amsterdam, v. 104, n. 1–2, p. 271–284, 2011.

MENGE, J. A.; DOUHAN, G. W.; McKEE, B.; POND, E.; BENDER, G. S.; FABER, B. Three new avocado rootstock cultivars tolerant to phytophthora root rot: “Zentmyer”, “Uzi”, and “Steddom”. **HortScience**, Alexandria, v. 47, n. 8, p. 1191–1194, 2012.

MORENO, S. G.; VELA, H. P.; ALVAREZ, M. O. S. La fluorescencia de la clorofila a como efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. **Revista de Educación Bioquímica**, Coyoacán, v. 27, n. 4, p. 119–129, 2008.

OQUIST, G.; WASS, R. A portable, microprocessor operated instrument for measuring chlorophyll fluorescence kinetics in stress physiology. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 73, n. 2, p. 211–217, 1988.

OUMA, G. Morphological and physiological parameters of avocado (*Persea americana*) rootstock seedlings as affected by different container sizes and different levels of irrigation frequency. **Journal of Biological Sciences**, Mumbai, v. 7, n. 6, p. 833–840, 2007.

OYARCE, P.; GUROVICH, L. Electrical signals in avocado trees: responses to light and water availability conditions. **Plant signaling & behavior**, Philadelphia, v. 5, n. 1, p. 34–41, 2010.

PAPAGEORGIOU, G. **Chlorophyll a fluorescence**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2004. 44 p.

PAPAGEORGIOU, G.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; STAMATAKIS, K. The fast and slow kinetics of chlorophyll a fluorescence induction in plants, algae and cyanobacteria: a viewpoint. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 94, n. 2–3, p. 275–290, 2007.

PLOETZ, R. C. Phytophthora root rot of avocado. In: LAMOUR, K. (Ed.). **Phytophthora: a global perspective**. Wallingford: CABI, 2013. v. 2, p. 197.

PLOETZ, R. C.; SCHAFFER, B. Effects of flooding and Phytophthora root rot on photosynthetic characteristics of avocado. **Proceedings of Florida State Horticulture Society**, Lake Alfred, v. 100, p. 290–294, 1987.

REED, S.; SCHNELL, R.; MOORE, J. M.; DUNN, C. Chlorophyll *a + b* content and chlorophyll fluorescence in avocado. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 4, n. 4, p. 29–36, 2012.

RICHARDSON, A. D.; DUIGAN, S. P.; BERLYN, G. P. An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. **New Phytologist**, Chichester, v. 153, n. 1, p. 185–194, 2002.

SARWAT, M.; AHMAD, A.; ABDIN, M. Z. **Stress signaling in plants: genomics and proteomics perspective**. New York: Springer New York, 2013. v. 1.

SCHAFFER, B.; GIL, P. M.; MICKELBART, M. V.; WHILEY, A. W. Ecophysiology. In: SCHAFFER, B.; WOLSTENHOLME, B. N.; WHILEY, A. W. (Eds.). **The avocado: botany, production and uses**. Wallingford: CABI, 2013. p. 168–199.

SCHAFFER, B.; WHILEY, A. W. Environmental regulation of photosynthesis in avocado trees – A mini-review. In: WORLD AVOCADO CONGRESS, 5., 2003, Viña Del Mar, Chile. **Anais...** Viña Del Mar: ACTAS, 2003.

SCORA, R. W.; BERGH, B. The origins and taxonomy of avocado (*Persea Americana* Miller Lauraceae. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 275, p. 387–394, 1990. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.1990.275.47>>.

STAUFFER, R. D. **Avocado tree**. 1986. Disponível em: <<http://www.freepatentsonline.com/PP05642.html>>. Acesso em: 13 out. 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Photosynthesis: Carbon reactions. In: ASSOCIATES, S. (Ed.). **Plant Physiology**. 5th ed. Armed: Sinauer Associates, 2010. p. 782.

VAZ, J.; SHARMA, P. K. Relationship between xanthophyll cycle and non-photochemical quenching in rice (*Oryza sativa* L.) plants in response to light stress. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 49, n. 1, p. 60–67, 2011.

WENG, J. H.; LAI, M. F. Estimating heat tolerance among plant species by two chlorophyll fluorescence parameters. **Photosynthetica**, Prague, v. 43, n. 3, p. 439–444, 2005.

WOLSTENHOLME, B. N.; WHILEY, A. W. Ecophysiology of the avocado (*Persea americana* Miller) tree as a basis for pre-harvest management. **Revista Chapingo**, Chapingo, v. 5, p. 77–88, 1999.

ZLATEV, Z. Drought-induced changes in chlorophyll fluorescence of young wheat plants. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, Oxfordshire, v. 23, n. 1, p. 438–441, 2014.

CAPÍTULO 3 – Resposta de dois porta-enxertos de *Persea americana*, obtidos por sementes, na presença de *Phytophthora cinnamomi* Rands

RESUMO – A expansão da cultura de abacateiro resulta no aumento da demanda de mudas, tanto para porta-enxerto como para variedade copa, de qualidade fitossanitária e genética. A obtenção de porta-enxertos é majoritariamente via semente de frutos de materiais locais ou por alporquia. A qualidade genética e fitossanitária para obtenção do porta-enxerto, definido pela demanda local ou limitações da região, baseia-se no uso de explantes de matrizes e de sementes livres de patógenos, especialmente *Phytophthora cinnamomi* Rands. Pelo anterior, analisou-se a resposta de uma população seminal dos materiais ‘Duke 7’ (D7) e ‘Toro canyon’ (TC), na fase de muda, em interação com *P. cinnamomi*. Em mudas de seis meses de idade, testaram-se três métodos de inoculação, sendo dois no caule: com ou sem ferimento mecânico na epiderme; ou no substrato. O delineamento experimental foi em blocos completos ao acaso. A unidade experimental foi composta de dez plantas. Mediram-se as variáveis biométricas: altura (cm), diâmetro (mm), taxa relativa de crescimento (TRC) e por amostragem destrutiva, massa seca (g) da parte aérea (MSPA), radicular (MSR), e total (MST), volume (VR) e densidade radicular (DR). Foram igualmente aferidas o Índice de clorofila A, B e Total durante 95 dias, e a eficiência quântica do FS II (zero, sete e 60 DAT). Caracterizou-se via microscopia ótica e eletrônica de varredura a incidência do patógeno nos primeiros estádios da doença. Os resultados sugerem que *P. cinnamomi* pode desenvolver lesões através de aberturas naturais do tecido; porém, a lesão desenvolvida foi maior no TC. Os índices de clorofila não diferiram entre os tratamentos. Após três meses, não houve diferença dos índices de clorofila entre os materiais e entre os tratamentos, nem interação entre as variáveis. A Fv/Fm no período avaliado diferiu entre os materiais, sendo maior no D7, porém após dois meses, no D7 inoculado no substrato foi maior que no inoculado no caule. Das variáveis biométricas, a interação entre os tratamentos e os materiais, em função do tempo sobre a altura e o diâmetro foi significativa. O D7 foi menor desde o começo, mas o crescimento em diâmetro do caule inoculado prévio ferimento foi menor. Pela análise da TCR, não houve interação entre os materiais e os tratamentos. Dos materiais, a TCR em altura e diâmetro foi maior no D7 e o diâmetro quando inoculado com ferimento, foi também reduzido. No final do experimento não houve interação entre os fatores sobre a massa seca e o volume radicular. Da análise histológica, observou-se maior divisão celular na presença do patógeno e por microscopia eletrônica sugere-se que o estabelecimento do patógeno é sucedido da degradação de tecido na região de inoculação.

Palavras-chave: doenças do abacateiro, estresse biótico, histologia, propagação

CHAPTER 3 – Response of *Persea americana* seedlings inoculated with *Phytophthora cinnamomi*

ABSTRACT – The increasing production areas results in the necessity of planting material of quality for, both rootstock and scion variety of commercial interest, with phytosanitary and genetic quality. Commercial production of avocado planting material for rootstock is mostly through seeds obtained from fruits of local materials and more recently by air layering. The genetics and plant quality for obtaining rootstock, defined by local demands or limitations of the region is based on the use of explants and seeds of healthy donor plants, especially free of *Phytophthora cinnamomi* Rands. Was analyzed the behavior of avocado seedlings, interacting with *P. cinnamomi*, using 'Duke 7' (D7) and 'Toro canyon' (TC) cultivars. Using six months old seedlings were tested three methods of inoculation of *P. cinnamomi*, being two in contact with the stem: with or without the epidermis mechanically injured; and on the substrate. The experimental design was randomized complete blocks. The experimental unit was 10 plants. Were measured: height (cm), diameter (mm), relative growth rate (RGR) and by destructive sampling: dry weight (g) of shoots (SDW), roots (RDW) and total (TDW); root volume (RV) and density (RD). Were also measured the chlorophyll index A, B and Total during 95 days, and the Fv / Fm (zero, seven and sixty DAT). Was characterized, using optical and scanning electron microscopy, the presence of the pathogen in the early stages of the disease. Preliminary results suggest that *P. cinnamomi* developed lesions on stem base through natural openings, being the wounded area higher in the TC. The Chl indexes were not difference between treatments, only the variation along the time of B and Total Chl differed between materials. Three months later, there was no difference of Chl indices between materials and between treatments or interaction between variables. The Fv/Fm was different between the materials, being higher in D7, and after two months, higher in D7 inoculated in the substrate than through the stem. For biometric variables, the interaction between materials and treatments, along the time, for height and stem diameter, was significant. The D7 plants were shorter than TC, and the diameter growth of previously wounded stem was lower. By the RGR analyses, there was no interaction between materials and treatments. For both cultivars, height and diameter RGR, was greater in D7, and comparing the treatments was lower when inoculation with injury. At the end of the experiment, was no interaction between the factors on dry weight and radicular volume. From histological analyses in the first stages of the symptoms development, was observed higher cell division in the pathogen presence. Observing electronic microscopy images, it was suggested that the pathogen establishment (15 days), is succeeded by tissue collapsing and abundant mycelium growth.

Keywords: avocado diseases, biotic stress, histology, propagation

3.1 Introdução

A produção mundial de abacate para exportação é aproximadamente de cinco milhões de toneladas, sendo liderada pelo México (32%) seguida do Chile (9%) e Estados Unidos (7%) (FAO, 2013), países em que é comum a incidência da podridão radicular causada por *Phytophthora cinnamomi* (FARR; ROSSMAN, 2015).

Phytophthora sp. é um Oomyceto que pertence ao reino Stramenipila. O gênero é constituído por aproximadamente 123 espécies, cuja ausência de quitina na parede celular, crescimento na ausência de esterol, entre outras características o diferenciam dos fungos verdadeiros (RIBEIRO, 2013). *Phytophthora cinnamomi* é um patógeno cosmopolita, do qual se tem referenciado mais de 700 hospedeiros, entre eles o abacateiro (FARR; ROSSMAN, 2015).

Entre os fatores que favorecem a disseminação do patógeno salienta-se a motilidade dos zoósporos e os diversos mecanismos de sobrevivência durante o seu ciclo biológico (HARDHAM, 2005; JUDELSON; BLANCO, 2005; CRONE et al., 2013). No entanto, sabe-se que alguns fatores no solo e na água disponível limitam seu crescimento, tais como a presença de cálcio e potássio, na forma de CaCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e KNO_4 , respectivamente (SUGIMOTO et al., 2005, 2009; CANADAY; SCHMITTHENNER, 2010; SERRANO et al., 2012).

Dentre as principais ferramentas de manejo da doença, relata-se a redução das vias de disseminação, tais como água, tecido, solo, ferramentas, assim como o uso de porta-enxertos de genótipos tolerantes ao patógeno sendo que, desses últimos os mais usados atualmente são: 'Dusa', 'Duke 7', 'Mexicola' e 'Toro canyon' (DOUHAN et al., 2005, 2011).

A propagação comercial do abacateiro, sob a ótica das técnicas utilizadas, é abordada em três sentidos: via sementes de parentais não definidos geneticamente, via clonagem dos parentais pela técnica de dupla enxertia, ou por micropropagação (WOLSTENHOLME, 2003). Dessas três, nas duas primeiras, diversas pesquisas sustentam as vantagens e desvantagens relacionadas à fidelidade genética, mas também ao custo e tempo para obtenção de mudas comerciais, desempenho em campo entre outras (GABOR, 1991; WESSELS, 1996; WHILEY, 2013).

A clonagem usando mudas por semente como porta-enxerto tem alta

variabilidade em função da época do ano e do genótipo (EGGERS; HALMA, 1936). Inicialmente, Frolich (1951) usando mudas enxertadas da raça guatemalense, observaram que o estiolamento dos ramos ajudou no enraizamento, e posteriormente descreveram a metodologia para produção comercial (FROLICH; PLATT, 1971). Melhoras recentes no aumento da eficiência da obtenção de mudas por esta via têm sido propostas pela empresa Wefstalia na África do Sul (KREMER-KÖHNE; VAN ROOYEN; KÖHNE, 2011).

Segundo Coffey (1992) a obtenção de porta-enxertos tolerantes deve ser via clonagem, para manter a identidade genética dos parentais, pois mudas por semente oriunda de matrizes tolerantes ou suscetíveis mostraram baixa tolerância, mas segundo Ploetz et al. (2002) a tolerância de mudas por semente de polinização aberta, obedece a vários fatores de origem gênica, à matriz doadora de pólen, condições do meio entre outras.

O mecanismo de tolerância não é compartilhado entre os materiais usados como porta-enxerto e na maioria deles não é bem entendido (DOUHAN et al., 2011). Chao e Menge (2002) indicam que a herdabilidade obedece a diversos fatores que devem ser considerados e sugerem que o melhor caminho para aumentar a tolerância é testando a progênie. Por sua vez, Engelbrecht e Van Den Berg (2013) atribuíram a tolerância a uma complexa expressão de vários genes em diferentes níveis.

Além do anterior, a via para obtenção de mudas deve considerar outros fatores, como a redução genética em populações clonais que não são mesuradas (COOK, 1983), além de que, o monocultivo incide na perda de biodiversidade, degradação dos recursos naturais e problemas na saúde dos abacaticultores (VILLAFÁN VIDALES; AYALA ORTIZ, 2014).

Considerando a relação *Phytophthora cinnamomi* – Abacateiro, diversos são os mecanismos que têm sido evidenciados nas respostas da planta, sendo sugeridos principalmente três: 1) liberação de exsudados pela raiz, que atraem os zoósporos (ZENTMYER, 1961; BOTHA; WEHNER; KOTZÉ, 1990; VAN WEST et al., 2002) definidos pela expressão de genes de defesa (BAETZ; MARTINOIA, 2014), mas que podem ou não determinar o encistamento dos zoósporos; 2) regeneração rápida de raízes (KELLAM; COFFEY, 1985; PLOETZ; SCHNELL; HAYNES, 2002) e 3) crescimento profundo no solo do sistema radicular que lhe permite “escapar” do

inóculo (SMITH; PAUER; SHOKES, 1992).

Para o estudo desses sistemas sob estresse biótico, ferramentas de avaliação da resposta tais como acúmulo de massa seca, estudos anatômicos, fluorescência do fotossistema II, fotossíntese, variáveis paramétricas, entre outras são comumente usadas (O’GARA et al., 1997; OYARCE; GUROVICH, 2010; CRONE et al., 2013; SGHAIER-HAMMAMI et al., 2013).

Diante do exposto, objetivou-se avaliar a resposta de mudas obtidas por semente, dos materiais, ‘Toro canyon’ (TC) e ‘Duke 7’ (D7), quando inoculadas com *Phytophthora cinnamomi* no caule e no substrato.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Definição prévia do isolado

Em mudas obtidas por semente, com quatro meses de idade, da cultivar ‘Ouro verde’ (sabidamente sensível à *Phytophthora cinnamomi*) foi testada a inoculação, com ferimento e sem ferimento prévio no caule, assim como os isolados LRS 21/88 e LRS 22/93, fornecidos pela Agência Paulista de Tecnologia Agropecuária - APTA regional Sorocaba, registrados na micoteca “Dra. Victoria Rosseti” (Tabela 3).

Tabela 3. Identidade dos isolados de *Phytophthora cinnamomi* da Micoteca "Dra. Victoria Rosseti", Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Sorocaba, usados para teste de patogenicidade.

ID Cultura	Hospedeiro	Município	Ano isolamento	Crescimento a 35°	Tipo
LRS 21/88	Abacateiro 'Fortuna'	Bragança Paulista	1984	(-)	A2
LRS 22/93	Abacateiro 'Margarida' (mudas)	Cordeirópolis-SP	1993	(-)	A2

Após 15 dias da inoculação, comparou-se a área da lesão (cm²) dos tratamentos, traçando em papel celofane transparente a área do sintoma e posteriormente mesurado usando o *Sistema Digital de Análise de Imagem-Delta T Devices*, calibrado a 1.0 mm² (Figura 14). Utilizou-se o delineamento completamente ao acaso, sendo a unidade experimental composta por seis plantas. Para a análise

das variáveis foi realizado ANAVA e, quando significativo, aplicado o Teste de Scott-Knott ($\alpha=5\%$).



Figura 14. Sistema Digital de Análise de Imagem-Delta T Devices usado para quantificação da área a partir do desenho da lesão no caule causada por *Phytophthora cinnamomi* em mudas de abacateiro.

3.2.2 Tolerância de mudas de abacateiro obtidas por sementes dos clones ‘Duke 7’ e ‘Toro canyon’ a *Phytophthora cinnamomi*

3.2.2.1 Obtenção de mudas de abacateiro ‘Duke 7’ e ‘Toro canyon’

Para obtenção das mudas de abacateiro ‘Duke 7’ e ‘Toro canyon’, as sementes foram extraídas de frutos fisiologicamente maduros, coletados diretamente das plantas. Posteriormente essas sementes foram desinfestadas por imersão em solução de NaOCl (2% i.a) e dispostas em vasos plásticos de 2L contendo substrato comercial Plantmax™, previamente autoclavado por uma hora (120° e 1,2 atm de pressão). Os vasos foram mantidos em casa de vegetação, sendo irrigados periodicamente para o bom desenvolvimento das mudas (Ver qualidade da água no Apêndice 4).

Quando completaram seis meses após germinação, essas mudas foram agrupadas em três blocos de dez plantas, usando-se a altura como parâmetro de agrupamento e dispostas em casa de vegetação (Figura 15) de maneira a deixar cada bloco sob condições similares de irradiância (Apêndice 2).

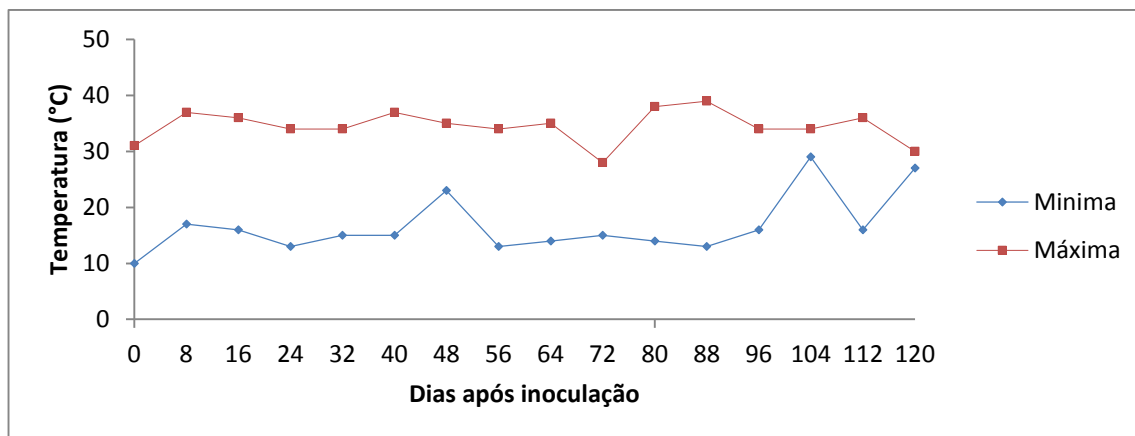


Figura 15. Temperatura máxima e mínima na casa de vegetação durante o tempo de condução do experimento de resposta de mudas por semente de abacateiro à inoculação com *Phytophthora cinnamomi*.

Para avaliar a resposta das mudas de abacateiro obtidas por sementes frente a *Phytophthora cinnamomi*, foram usadas três metodologias de inoculação: inoculação de discos de micélio do fungo no caule da planta pouco acima do nível do solo com (CF) e sem fermento (SF) prévio da epiderme e inoculação do patógeno pelo substrato (Subs.).

Para as inoculações foram utilizados discos de micélio de 0,5 cm de diâmetro e sementes de milho colonizadas com micélio do isolado selecionado no teste prévio de patogenicidade, crescendo por sete dias, em meio de cenoura-ágar – CA (Apêndice 5) em condições de luz contínua e temperatura ambiente em torno de 25°C. Foram colocados, com a face de crescimento das estruturas do fungo voltada para o caule. No tratamento com fermento prévio, utilizando-se estilete pontiagudo (ponta de 1mm), perfurou-se o caule até a epiderme (Figura 16).

Após a inoculação via caule, colocou-se o disco de micélio coberto com algodão umedecido e envolto com fita de vinilo. O algodão foi hidratado diariamente com água (três gotas), até o momento da avaliação, para evitar queda de inóculo no substrato (Figura 17).

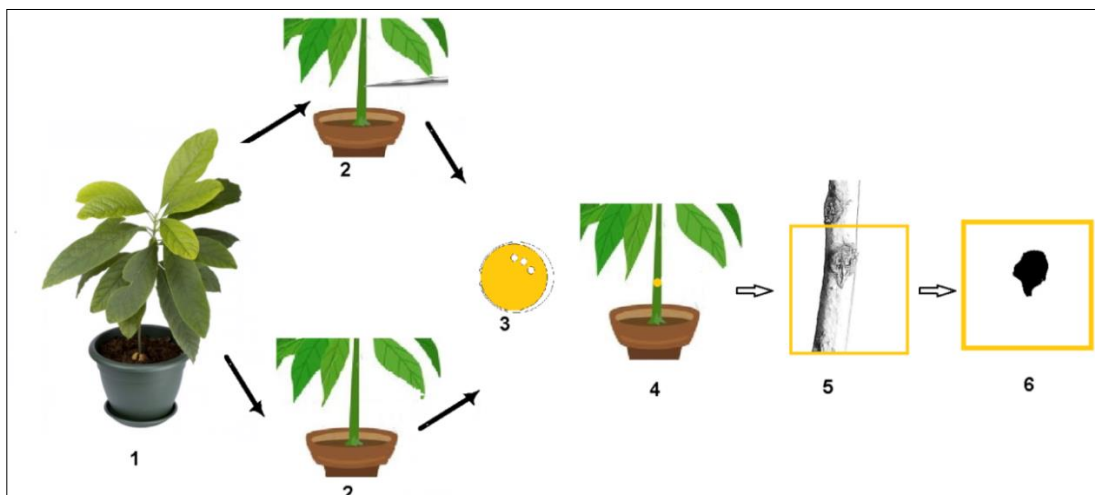


Figura 16. Metodologia de inoculação e avaliação do desenvolvimento da lesão causada por *P. cinnamomi* no caule de mudas de abacateiro. 1. Muda obtida de semente; 2. Tratamento sem ou com fermento; 3. Meio Cenoura-Agar com *P. cinnamomi*; 4. Porção de meio colocada na base do caule; 5. Área da lesão após 15 dias.

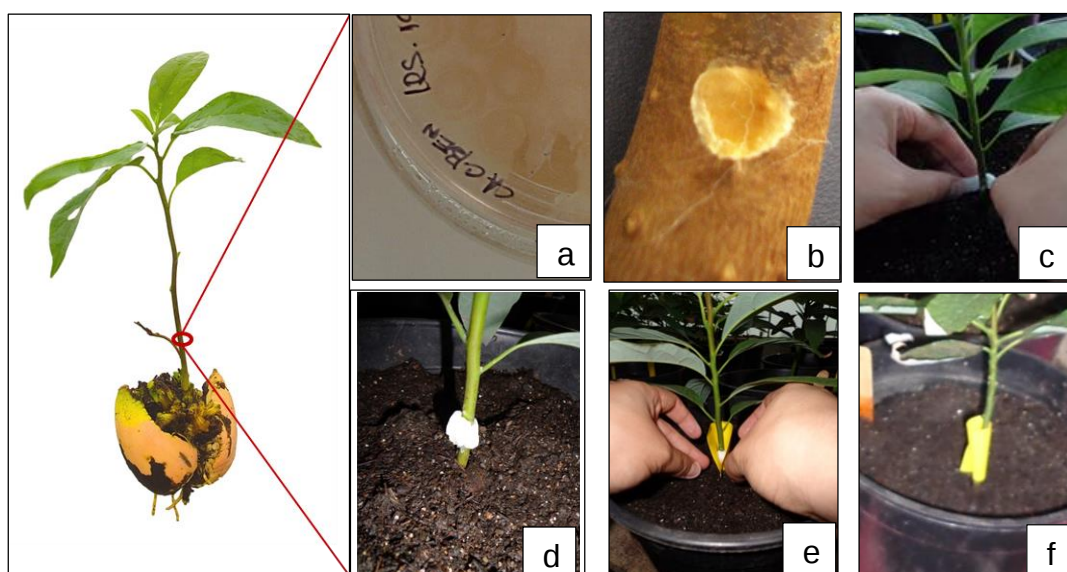


Figura 17. Sequência geral para inoculação no caule de mudas de abacateiro: a. porção de Meio usado como inoculo; b. Porção de meio na base do caule; c, d. Cobertura com porção de algodão; e, f. Fita para manter a aderência e evitar contaminação.

Na inoculação do substrato, utilizaram-se sementes de milho previamente colonizadas como fonte do patógeno. Para isso, as sementes foram inicialmente esterilizadas em autoclave, por três dias consecutivos (120 °C e 1,2 atm de pressão). Posteriormente, discos de micélio com o fungo foram colocados em contato com as

sementes autoclavadas, contidas em Erlenmeyer de 500 mL. Diariamente as sementes foram agitadas para melhor homogeneização no crescimento do fungo. Esse processo durou 15 dias.

Foram colocados 10 mL da semente no substrato junto ao colo da planta. Os vasos irrigados duas vezes por dia com 200 mL de água por vez.

Após 45 e 180 dias da inoculação do substrato, e após seis meses da inoculação no caule das plantas, foi conferida a presença de *Phytophthora cinnamomi* viável.

Para detecção do patógeno no substrato, usou-se o método de iscas referenciado por O'Brien; Williams e Hardy (2009). Assim, uma amostra de 10 g de substrato por vaso foi colocada individualmente em copos de 50 mL e adicionados 10 mL de água esterilizada e cinco fragmentos de pétalas de rosa de aproximadamente 0,025cm², os quais permaneceram na superfície da suspensão. Os copos foram cobertos com parafilme e dispostos em condições ambiente por quatro dias para posterior confirmação da presença de esporângios de *Phytophthora cinnamomi* nas bordas dos fragmentos das pétalas (Figura 18).

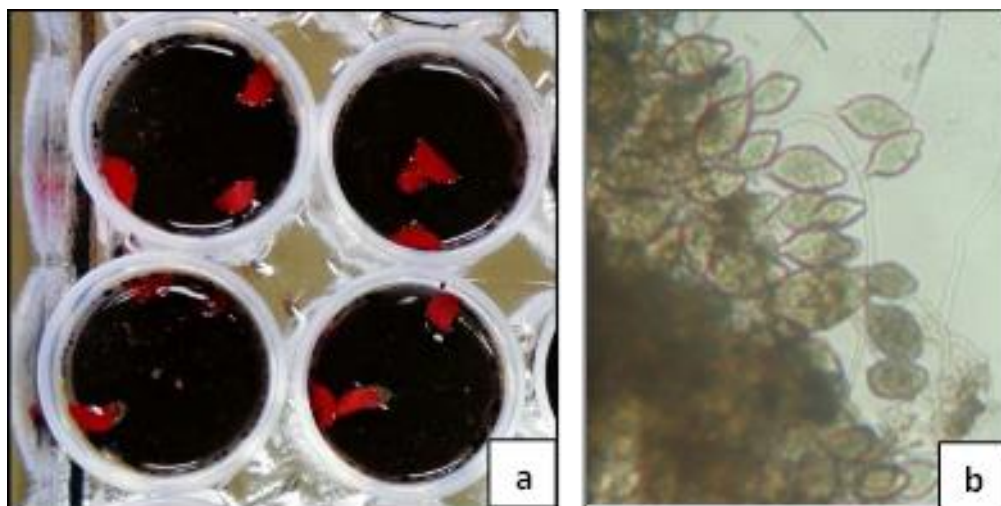


Figura 18. Método de isca com pétalas de rosa usado para detecção de *Phytophthora cinnamomi* em substrato; a: Iscas de pétalas na solução água + substrato; b: Esporângios formados na borda da porção de pétala usada como isca após quatro dias.

No caso do caule das plantas, retirou-se um fragmento de três centímetros da região inoculada. Foram então realizados dois testes paralelos para a detecção do

fungo, o método da isca descrito anteriormente e o plaqueamento dos fragmentos do caule em meio semi-seletivo PARPH modificado (JEFFERS; MARTIN, 1986). Para plaqueamento em meio de cultura, o tecido do caule foi desinfestado por cinco minutos em NaOCl (1% i.a.) e colocado na superfície solidificada. Foram incubados à temperatura ambiente (25 °C) e irradiância de $10 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ por uma semana.

3.2.3 Avaliação fisiológica das mudas durante o desenvolvimento da doença

A partir do momento da inoculação e até 60 dias após, semanalmente foram quantificados o índice de clorofila A, B e Total, e complementarmente medida, zero sete e sessenta dias após inoculação, a Fv/Fm.

Para quantificação do índice de clorofilas A, B e Total foi utilizado o clorofilômetro (Falker, mod. clorofiLOG) em um dos lados (direito/esquerdo) da quinta folha completamente expandida.

Para Fv/Fm, na sétima folha completamente expandida, foi utilizado fluorômetro portátil (Hansatech, mod. PEA MK2), cuja unidade sensor/iluminação provê luz vermelha (650 nm) numa área foliar de 4 mm^2 . Para a determinação dos valores da fluorescência foram considerados os valores F0 e Fm e da relação Fv/Fm, onde F0= fluorescência inicial, Fm= fluorescência máxima e Fv = fluorescência variável (F0-Fm) (OQUIST; WASS, 1988) com sete minutos de saturação de luz e pré-aclimatação da folha no escuro por 30 minutos usando a irradiância de $560 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 19).

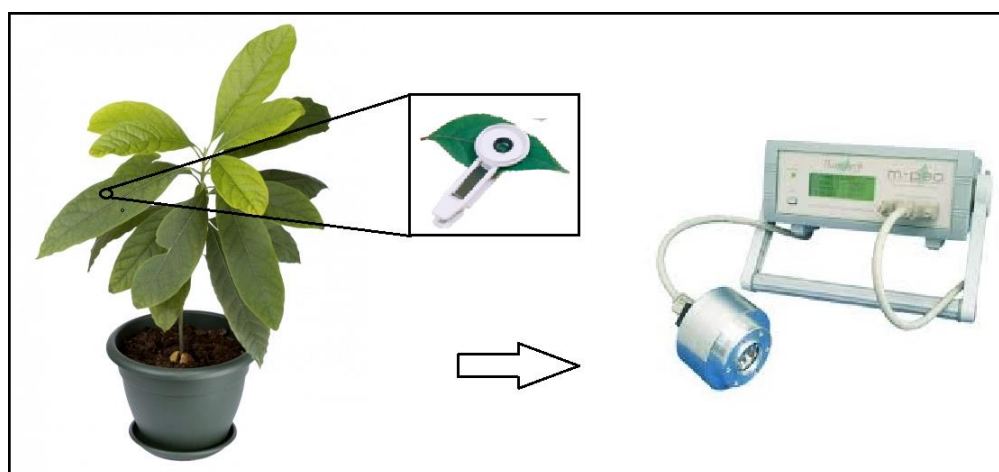


Figura 19. Quantificação da eficiência quântica do FS II em mudas de abacateiro; na sétima folha completamente expandida, prévia aclimação no escuro, utilizado fluorômetro.

3.2.3.1 Análise estatística

A análise do índice de clorofila ao longo do tempo foi realizada por comparação de médias pelo teste Skott-nott ($\alpha=0,05$), sempre que a distribuição dos erros foi normal (Cramér-von Mises $P \leq 0,05$) e, quando significativo, foi realizada regressão da análise de variância para ajuste do modelo.

Para Fv/Fm, os dados de cada avaliação foram analisados em arranjo fatorial 2x3, sendo dois materiais e três tratamentos. Foi realizada comparação de médias pelo teste Skott-nott ($\alpha=0,05$) sempre que a distribuição dos erros foi normal (Cramér-von Mises $P \leq 0,05$).

3.2.4 Avaliação biométrica das mudas durante o desenvolvimento da doença

Semanalmente foi medida a altura (cm) das mudas, desde um centímetro acima da região do colo até a região do ápice caulinar, bem como o diâmetro (mm) na base do caule. Considerando a máxima altura e diâmetro atingidos até o fim do experimento, calculou-se a taxa relativa de crescimento (TRC) baseado na fórmula

$$TRC = (\frac{\overline{Ln M2}}{Ln M2} - \frac{\overline{Ln M1}}{Ln M1}) / (t2-t1)$$

proposta por Hoffmann e Poorter (2002), onde: M_i = Medida (Massa ou diâmetro) no tempo i ; $t2$ = *Tempo final*; $t1$ = *Tempo inicial*.

A área da lesão (cm²) dos tratamentos foi avaliada após 15 dias traçando em papel celofane transparente a área do sintoma e posteriormente mensurada usando o *Sistema Digital de Análise de Imagem-Delta T Devices*, calibrado a 1.0 mm².

Após três meses de inoculação foram realizadas as análises de massa seca de raiz e parte aérea (g) e volume radicular (mL). Para determinação de massa seca de raízes e parte aérea, as plantas foram colocadas dentro de saco de papel em estufa de secagem a 45 °C, até atingirem massa constante.

Para o cálculo de volume radicular, pelo princípio de Arquimedes, as raízes previamente lavadas, foram colocadas dentro de uma proveta de 1000 mL e o volume completado com água até atingir o máximo determinado, posteriormente as raízes foram retiradas da proveta, e pela diferença, calculado o volume radicular. Finalmente, a densidade radicular (dr) (g/mL) foi calculada pela fórmula $dr = m/v$, em que: m =

massa e v = volume (Figura 20).

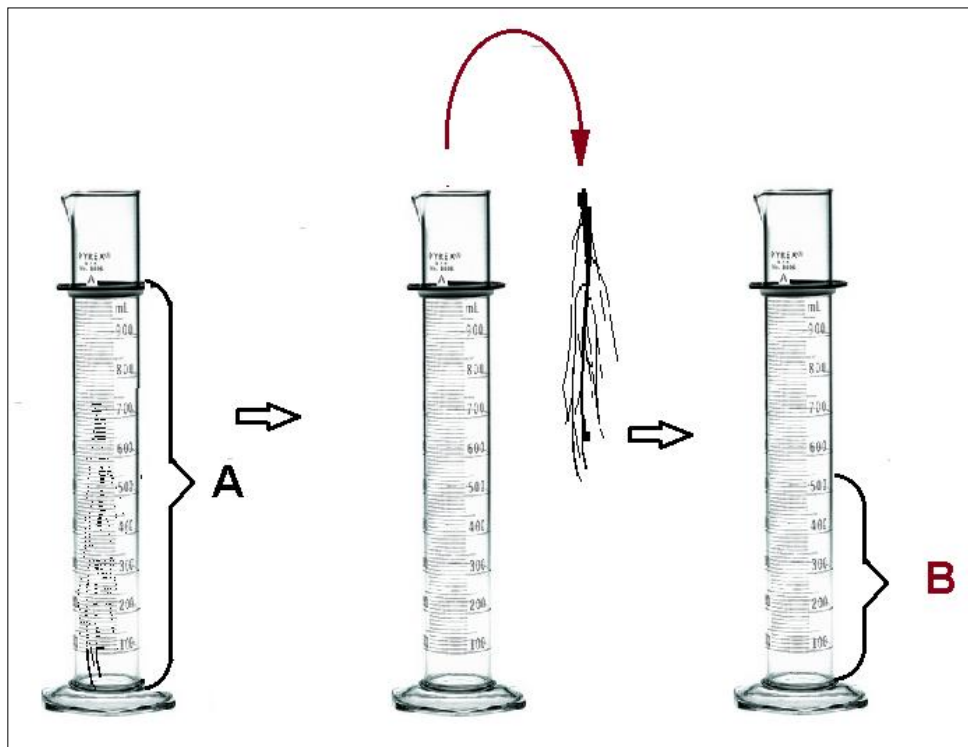


Figura 20. Metodologia usada para medição do volume de raiz em mudas de abacateiro após inoculação com *Phytophthora cinnamomi*. Volume inicial de água mais sistema radicular (A) e volume final de água (B).

3.2.4.1 Análise estatística

Para as variáveis diâmetro (mm) e altura (cm), ao longo do tempo, foi realizada por regressão da análise de variância para ajuste do modelo. Para as variáveis biométricas: área da lesão (cm²), massa seca de raiz e parte aérea (g) e volume de raiz (mL) foi realizada comparação de médias pelo teste Skott-nott ($\alpha=0,05$) sempre que a distribuição dos erros foi normal (Cramér-von Mises $P \leq 0,05$). Os dados de altura e diâmetro foram transformados pela raiz (x).

3.2.4.2 Análise de correlação

Com o intuito de comparar possíveis relações entre o índice de clorofila e as variáveis biométricas quantificadas, a partir das medias dos tratamentos, realizou-se

entre os materiais, a análise do coeficiente de correlação linear de Pearson.

A análise foi realizada usando apenas as médias dos tratamentos considerando os resultados obtidos no final do experimento.

O coeficiente de correlação positivo e $P < 0,05$ tende a aumentar junto, enquanto que o coeficiente de correlação negativo e $P < 0,05$, uma variável tende a diminuir enquanto a outra aumenta; $P > 0,05$, não há relação significativa entre as duas variáveis.

3.2.5 Caracterização histológica por microscopia ótica do caule de plantas de abacateiro, na região de inoculação com *Phytophthora cinnamomi*

Tecido caulinar das mudas de D7 e TC, com seis meses de idade, foi coletado para caracterização em três condições: a) caule intacto; b) ferimento mecânico após quinze dias; e c) ferimento mais inoculo.

De cada amostra, a análise de medição dos tecidos que compõem o caule foi feita comparando a metade sob tratamento com a metade intacta (Figura 21). Foi comparado entre os tratamentos: espessura da epiderme, floema, xilema, e diâmetro médio dos vasos do xilema secundário (μm). As lâminas foram fotografadas com o microscópio ótico e analisadas com o programa *Image J*®.

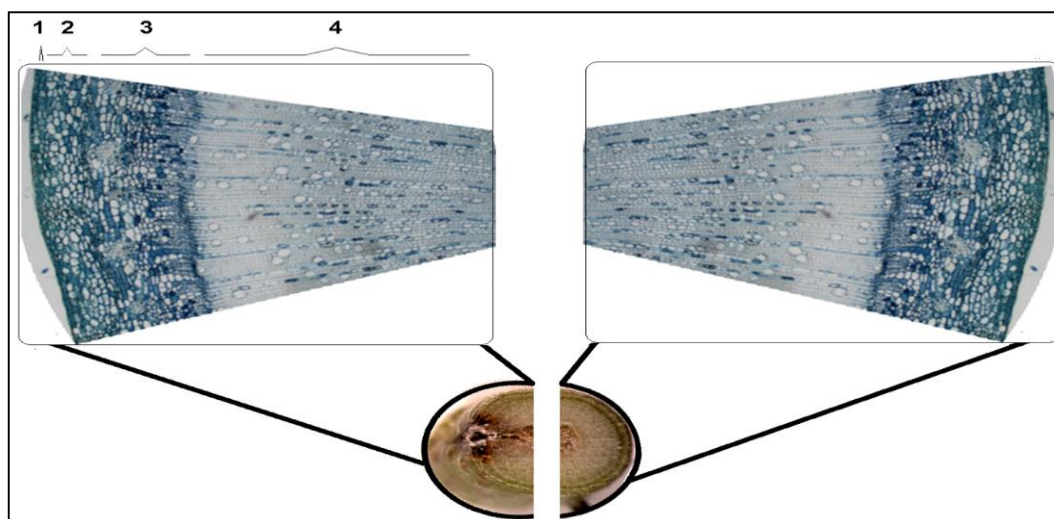


Figura 21. Diagrama das regiões do caule de abacateiro tratado (esquerdo) e intacto (direito) para medir as alterações causadas pelo *Phytophthora cinnamomi*: espessura da epiderme (1), floema (2), xilema (3), e diâmetro médio dos vasos do xilema secundário (4).

A metodologia descrita para o preparo do material constou das seguintes etapas: fixação, desidratação, inclusão (parafina), seccionamento e montagem dos cortes, coloração, desparafinização e montagem das lâminas.

Seguindo o descrito por Johansen (1940), para fixação, porções transversais de aproximadamente três milímetros de espessura do caule na região do ferimento foram cortadas finamente e coletadas separadamente em vidro contendo FAA (formol, álcool etílico 95%, ácido acético glacial, e água destilada) (Apêndice 3).

Para desidratação, os cortes passaram por uma série gradual de álcool absoluto (70, 85, 95 e 100%) por duas horas em cada e por três dias em álcool TBA (tert-Butyl alcohol), sendo renovado a cada 24 horas e finalmente, colocados em mistura (1:1) de TBA e óleo de vaselina. Posterior à desidratação, realizou-se a inclusão das secções em parafina histológica por 12h no primeiro banho e mais duas trocas de 4h cada na estufa a 60 °C.

Para seccionamento, o bloco foi posicionado no micrótomo rotativo ajustado para 10 µm de espessura e realizados os cortes das secções desejadas. Para o preparo da lâmina, estas foram colocadas previamente sobre placa aquecedora (40 °C), seguidamente feita uma camada de adesivo de Meyer, e colocada a fita de parafina contendo os cortes de interesse e deixadas em temperatura ambiente por 24h.

A coloração e desparafinização foram feitas seguindo o protocolo de Sakai (1993). Para isso, as lâminas com os cortes parafinados foram deixadas submersas em azul de toluidina (0,05 g/mL) por dois minutos e lavadas três vezes com água corrente. Para retirar a parafina, as lâminas foram colocadas em xilol, três vezes de 30 minutos, cada.

3.2.5.1 Análise estatística

Para medição da espessura da epiderme, floema e xilema foram utilizadas três repetições e 50 para o diâmetro dos vasos do xilema secundário. Das variáveis histológicas foi realizada comparação de médias pelo teste Skott-nott ($\alpha=0,05$) sempre que a distribuição dos erros foi normal (Cramér-von Mises $P \leq 0,05$).

3.2.6 Caracterização histológica por microscopia de varredura

A montagem e preparo do material a ser analisado foram feitos seguindo a metodologia do Laboratório de Microscopia eletrônica da FCAV-UNESP.

Para isso, usando tecido da base do caule foram feitas secções transversais de cortes à mão livre (± 1 mm de espessura), as quais foram fixadas inicialmente em glutaraldeído 3% ($C_5H_8O_2$), em tampão de fosfato de potássio a 0,1 M e pH 7,4, por dois dias, depois, lavadas cinco vezes com mesmo tampão em intervalos de 15 minutos para retirar o excesso do fixador.

Posteriormente, para fixação de ultraestruturas, essas foram colocadas por seis horas em tetróxido de ósmio (O_4Os) 1%, e desidratadas em série gradual de álcool etílico (C_2H_6O) (30, 50, 70, 80, 90 e 100 %), por 20 minutos em cada, seguidamente colocadas em secador de ponto crítico usando CO_2 (38 °C e 1200 PSI).

Após secagem, as amostras foram montadas em porta amostras e metalizadas com banho de ouro (espessura ± 30 nm) para serem eletromicrografadas. Foi utilizado microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 5410, operado em 15 kV.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Definição prévia do isolado

Após quinze dias da inoculação de *Phytophthora cinnamomi* em mudas de abacateiro 'Ouro verde' a avaliação dos sintomas não mostrou diferença entre os tratamentos, com e sem ferimento no caule ($P=0,963$), mas sim entre os isolados testados, sendo que, o isolado LRS 21/88 proporcionou maior área de lesão no caule ($P=0,031$).

Embora não fosse significativa ($P=0,095$), quando desdobrada a interação dentro do tratamento sem ferimento, a área da lesão causada pelo isolado LRS 21/88 foi maior que do isolado LRS 22/93 e na testemunha ($P=0,024$).

A partir desses resultados adotou-se o uso do isolado LRS 21/88 para avaliar a resposta do 'Duke 7' e 'Toro canyon' por inoculação no caule, com e sem ferimento, com a inoculação no substrato.

3.3.2 Tolerância de mudas de abacateiro obtidas por sementes dos clones ‘Duke 7’ e ‘Toro canyon’ a *Phytophthora cinnamomi*

As comparações das variáveis, tanto na inoculação no caule quanto na presença do patógeno no substrato, evidenciaram claramente que a resposta a *Phytophthora cinnamomi* é genótipo-dependente.

Na inoculação do caule, o desenvolvimento da lesão foi maior no ‘Toro canyon’ -TC do que no ‘Duke 7’ - D7, independente do ferimento prévio a inoculação. Isso também foi observado em outros trabalhos (O’GARA et al., 1997; O’GARA et al., 2015) em que *Phytophthora* penetraria diretamente nas células da epiderme, ou por estômatos, ou quaisquer outras aberturas naturais (VAZ et al., 2011).

Da mesma forma, não houve interação entre os fatores tratamento e material sobre a área da lesão desenvolvida pelo patógeno (Tabela 4).

Tabela 4. Resumo da análise de variância da interação em mudas de abacateiro ‘Toro canyon’ e ‘Duke 7’ com e sem ferimento mecânico, sobre a área da lesão no caule após 15 dias causada por *Phytophthora cinnamomi*.

Fonte de variação	Média (cm ²)
Materiais	
Toro canyon	0,38 a
Duke 7	0,12 b
Tratamento	
Com ferimento	0,27 ns
Sem ferimento	0,23
	Valor P
Material (A)	0,038*
Tratamento (B)	0,542 ^{ns}
Inter. AxB	0,149 ^{ns}
CV (%)	11,35

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$); ns: não significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \geq 0,05$)

Confirmou-se a presença do patógeno pelo método de isca em 100% dos vasos inoculados no substrato com *Phytophthora cinnamomi*, tanto 45 como 180 dias após inoculação. A presença, no substrato, do inoculo ao longo do tempo de desenvolvimento do experimento, passando por dias de alta e baixa temperatura, evidenciam, de acordo com Hardham (2001, 2005), que *P. cinnamomi* aproveita os mecanismos de adaptação para se manter latente no substrato e tecido radicular

diante de condições desfavoráveis.

No entanto, na taxa de recuperação do tratamento no caule em meio de cultivo não houve correlação com a presença de sintoma, ou seja, o patógeno nem sempre se recuperou de caule sintomático, mas de caule assintomático houve re-isolamento. Os resultados obtidos podem estar associados a que a referida recuperação proveniente do tecido assim como a irregularidade das lesões estão condicionadas tanto ao procedimento quanto à técnica utilizada (ALMARAZ-SÁNCHEZ; ALVARADO-ROSALES; SAAVEDRA-ROMERO, 2013; HILBERW; HARDY, 2000; O'BRIEN; WILLIAMS; HARDY, 2009; O'GARA et al., 2015) bem como à etiologia da doença (O'GARA et al., 1997; OSSWAL et al., 2014).

3.3.3 Alterações fisiológicas das mudas durante o processo da doença

Índice de clorofila: Analisando os efeitos simples, entre os materiais de abacateiro, os índices de clorofila A, B e Total e a relação a/b foram maiores no D7, sem incidência dos tratamentos de inoculação. Para as interações, quando comparada à variação entre os materiais em função do tempo, somente a da chl B e Total foram significativas (Tabela 5).

Tabela 5. Análise de variância e de regressão do índice de clorofila A, B e Total em mudas por semente de abacateiro 'Toro canyon' (TC) e 'Duke 7' (D7) inoculadas com *Phytophthora cinnamomi* pelos métodos: Inoculação sem ferimento, Inoculação com ferimento e presença no substrato.

Fonte de variação	Valor P
Índice de clorofila A	
Material (A)	<0,01
DAI (B)*	-----
Tratamento (C)	≥ 0,05
Inter. AxB	≥ 0,05
Inter. AxC	≥ 0,05
Inter. BxC	≥ 0,05
Inter. AxBxC	≥ 0,05
Regressão quadrática (TC)	<0,0001
Regressão linear (D7)	<0,0001
CV (%)	3,38
Índice de clorofila B	
Material (A)	<0,01
DAI (B)*	-----
Tratamento (C)	≥ 0,05
Inter. AxB	0,01 ≤ p < 0,05
Inter. AxC	≥ 0,05
Inter. BxC	≥ 0,05
Inter. AxBxC	≥ 0,05
Regressão quadrática (TC)	0,0002
Regressão quadrática (D7)	0,046
CV (%)	7,92
Índice de clorofila Total	
Material (A)	<0,01
DAI (B)*	-----
Tratamento (C)	≥ 0,05
Inter. AxB	<0,01
Inter. AxC	≥ 0,05
Inter. BxC	≥ 0,05
Inter. AxBxC	≥ 0,05
Regressão quadrática (TC)	<0,01
Regressão linear (D7)	0,0005
CV (%)	4,34
Relação Chl a/b	
Material (A)	<0,01
DAI (B)*	-----
Tratamento (C)	≥ 0,05
Inter. AxB	≥ 0,05
Inter. AxC	≥ 0,05
Inter. BxC	≥ 0,05
Inter. AxBxC	≥ 0,05
Regressão quadrática (TC)	0,026
Regressão ns (D7)	≥ 0,05
CV (%)	11,85

* Foi realizada análise de regressão; P valor ≥ 0,05 diferença não significativa.

O índice de clorofila, semelhante ao referido por Vincent, Rowland e Schaffer (2015) não foi sensível às pequenas variações na resposta fotossintética da planta na

fase inicial da doença, porém sua variação ao longo do tempo pode ser um indicativo de alterações nas plantas (ASHRAF; HARRIS, 2013). De acordo com Osswal, et al. (2014), a condutância estomática e a transpiração são mais sensíveis a variações que ocorrem na planta antes de serem visíveis, como por exemplo os sintomas com podridão é a clorose causada por *P. cinnamomi*.

A diferença no índice de clorofila entre as mudas de D7 e TC pode ser devido à capacidade diferenciada de aclimação entre os materiais. Embora a relação a/b tenha diferido entre eles, fisiologicamente não se considera representativa. Segundo Matsubara et al. (2011) a relação superior a 4 indicaria o tamanho reduzido da antena. Nos materiais estudados foi de 2,5 para o TC e 2,8 para o D7.

Por outro lado, os teores de chl A, B e total em plantas lenhosas estão associados com a resposta do aparato fotossintético, e sua resposta ao ambiente (PALLARDY, 2010). Maiores teores de clorofila são esperados de fotossistemas adaptados a ambientes sombreados (REED et al., 2012), o que segundo os resultados obtidos, indica melhor aclimação do D7.

Em função do tempo após inoculação, o comportamento das variáveis avaliadas foi dependente do material. No TC tanto o índice chl A, B e Total representaram-se pela regressão quadrática com inflexão positiva a partir do segundo mês (Figura 22a). No D7, a resposta em função do tempo ajustou-se à regressão linear positiva na chl A e Total, e o modelo quadrático na chl B, sugerindo-se que, nesta última, há redução a partir do segundo mês (Figura 22b e 22c).

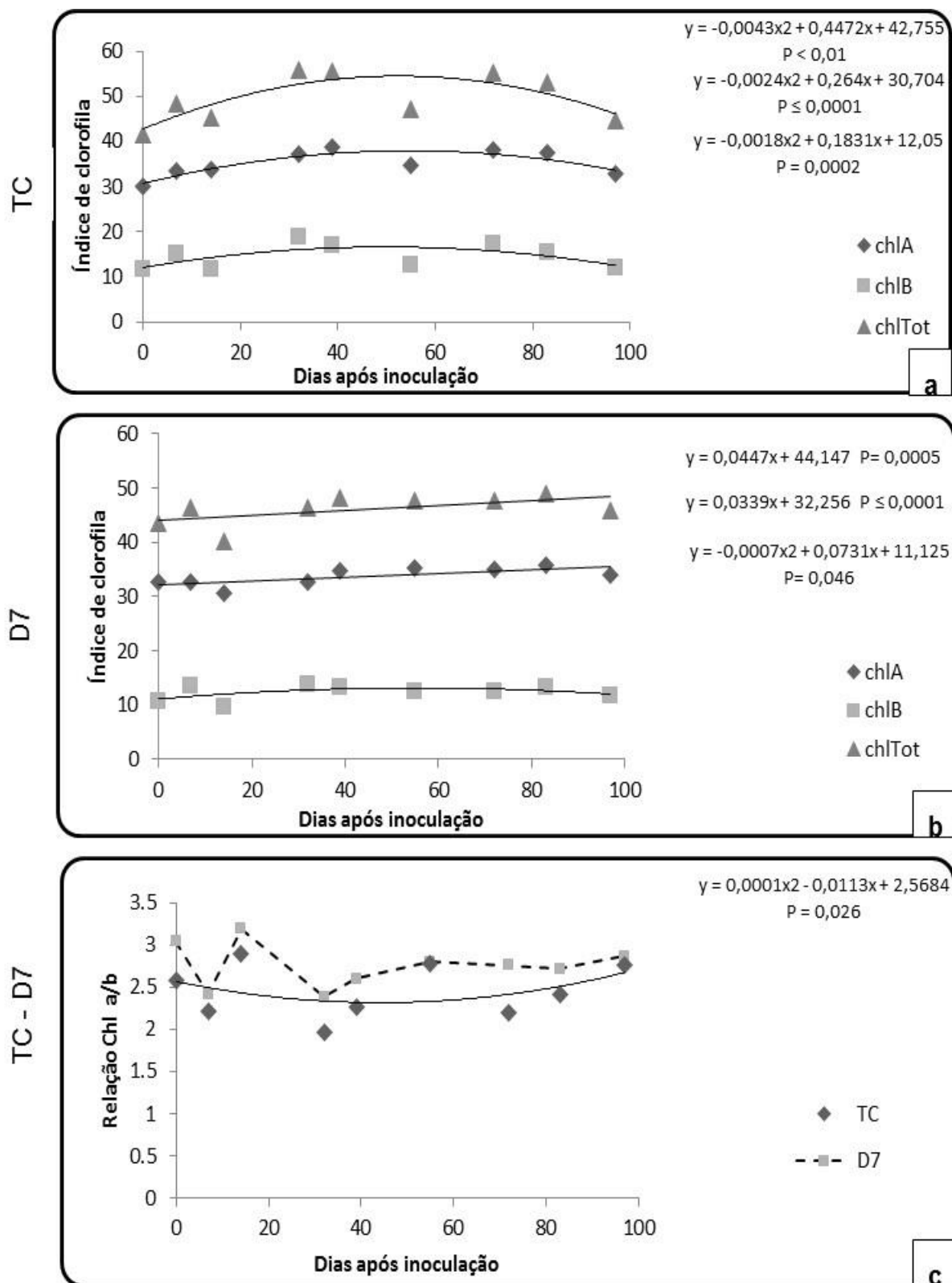


Figura 22. Regressão da análise de variância do índice de clorofila A (chl A), B (chl B), Total (chl Total) em mudas de abacateiro 'Toro canyon' (a) e 'Duke 7' (b) e a relação a/b (c) durante 97 dias a partir da inoculação com *Phytophthora cinnamomi*.

Após 97 dias de inoculação não houve diferença nem entre os tratamentos nem entre os materiais, sendo que a chl A foi em média 36,64 e a da clorofila B e Total foram, respectivamente, 11,87 e 45,3. Em relação aos efeitos da interação, não foram significativos entre o material e o tratamento em nenhuma das variáveis analisadas (Tabela 6).

Tabela 6. Análise de variância do índice de clorofila A, B e Total após 97 dias de inoculação com *Phytophthora cinnamomi* em mudas de Toro canyon e Duke 7.

Fonte de variação	Índice de clorofila			
	A	B	Total	Relação a/b
Material (A)				
TC	32,8	11,87	44,7	2,8
D7	35,84	11,86	45,9	2,9
Tratamento (B)				
CF	33,3	11,7	44,9	2,9
SF	34,7	13,1	47,8	2,7
Subs.	32,3	10,8	43,2	3,0
Interação				
AxB	---	---	---	---
P (A)	0,409 ns	0,992 ns	0,640 ns	0,660 ns
P (B)	0,392 ns	0,265 ns	0,326 ns	0,264 ns
P (AxB)	0,427 ns	0,217 ns	0,318 ns	0,092 ns
CV (%)	8,67	19,25	11,34	10,71

SF: Inoculação sem fermento; CF: Inoculação com fermento; Subs: Presença no substrato * ns não significativo ($p \geq 0,05$). Os dados de Clorofila a, b e Total foram transformados pela fórmula $1/\sqrt{X}$

Eficiência quântica do FS II -Fv/Fm: A Fv/Fm, amplamente usada em estudos de resposta das plantas ao estresse (KRAUSE; WEIS, 1991; PAPAGEORGIOU; TSIMILLI-MICHAEL; STAMATAKIS, 2007), no presente estudo, em previa inoculação e uma semana após aplicação dos tratamentos, foi diferente apenas entre os materiais, sendo maior no D7, mas sem diferença entre os tratamentos.

Nas primeiras semanas de inoculação são visíveis as primeiras variações na região de inoculação do patógeno do caule; no entanto, as variáveis fotossintéticas avaliadas podem não ser indicativos sensíveis às primeiras alterações (REEKSTING; TAYLOR; VAN DEN BERG, 2014). No entanto, outros autores atribuem a estabilidade da fluorescência à tolerância dos materiais diante de uma condição específica de estresse (ATUCHA; EMMETT; BAUERLE, 2014; MARTÍNEZ-FERRI et al., 2016).

Em contraposição, outros trabalhos evidenciam diante dos danos associados

com a doença a resposta da eficiência quântica do FS II é tardia em comparação com outras variáveis, tais como a condutância estomática e não facilmente associado com tolerância. Por um lado, no estudo da incidência de *Rafaellea lauricola*, Inch e Ploetz (2012) observaram variação na Fv/Fm apenas vinte após inoculação similar ao estudo de resposta a estresse abiótico em *Carica papaya* (VINCENT; ROWLAND; SCHAFFER, 2015).

Já após dois meses de tratamento, os efeitos da interação entre os tratamentos foram significativos, sendo que a diferença entre os materiais se manteve, mas apenas as plantas de D7 inoculadas pelo substrato tiveram maior relação Fv/Fm em comparação com as inoculadas no caule, sendo que entre estas últimas não houve diferença (Tabela 7).

A resposta do aumento da Fv/Fm de plantas tolerantes nas primeiras fases do tratamento tem sido evidenciada em outros trabalhos e descrita como suporte em programas de melhoramento (ATUCHA; EMMETT; BAUERLE, 2014; BAURIEGEL; HERPPICH, 2014). Entre os tratamentos, o dano causado na raiz pode ser maior em comparação ao do caule, porém no D7 é conhecido o incremento no desenvolvimento radicular em resposta à *P. cinnamomi* que pode ter incidido no incremento da Fv/Fm.

Tabela 7. Resumo da análise de variância da eficiência quântica do FS II - Fv/Fm em mudas de abacateiro quando inoculadas com *Phytophthora cinnamomi*, no momento da inoculação (0d) e após sete (7 d) e sessenta dias (60 d).

Fonte de variação	Fv/Fm		
	0d	7d	60d
Material (A)			
TC	0,777 b	0,766 b	0,586 b
D7	0,789 a	0,794 a	0,654 a
Tratamento (B)			
CF	0,782 ns	0,768 ns	0,612 b
SF	0,784	0,788	0,610 b
Subs.	0,784	0,784	0,640 a
Interação			
AxB.			
P (A)	0,048	0,029	≤ 0,0001
P (B)	0,972	0,580	0,005
P (AxB)	0,101	0,215	0,004
CV (%)	1,41	2,89	2,21

SF: Inoculação sem ferimento; CF: Inoculação com ferimento; Subs: Presença no substrato

* As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade

3.3.4 Alterações biométricas das mudas de abacateiro durante o desenvolvimento da doença

Altura e diâmetro: No desenvolvimento em altura (cm) e diâmetro (mm) do caule, a interação do material e o tratamento em função do tempo foram significativos, isto é, a altura e o diâmetro no tempo de avaliação diferiram entre os materiais (Tabela 8), sendo que a altura das plantas de Duke 7 foi menor que as de TC.

Tabela 8. Resumo da análise de variância da altura e diâmetro de mudas de abacateiro 'Duke 7' e 'Toro canyon' durante 97 dias após inoculação (DAI) com *Phytophthora cinnamomi* no caule com ferimento (CF), sem ferimento (SF) ou no substrato (Subs.).

Fonte de variação	Valor P
ALTURA	
Material (A)	$\leq 0,01$
Tratamento (B)	$0,01 \geq P \geq 0,05$
DAI (C)	-----
Inter. AxB	$\leq 0,01$
Inter. AxC	$\leq 0,01$
Inter. BxC	$\leq 0,01$
Inter. AxBxC	$\leq 0,01$
CV (%)	6,20
DIÂMETRO	
Material (A)	$\geq 0,05$
Tratamento (B)	$\leq 0,01$
DAI (C)	-----
Inter. AxB	$\leq 0,01$
Inter. AxC	ns
Inter. BxC	ns
Inter. AxBxC	$\leq 0,01$
CV (%)	4,89

* Os dados foram transformados pela equação $\sqrt{x}$

No desdobramento da análise de interação dos tratamentos para cada material, ao longo do período de avaliação, para a altura, o modelo ajustado nos três tratamentos do D7 foi o quadrático, observando-se maior taxa de crescimento no começo e menor no final do período avaliado, entanto que a do TC foi mais homogênea.

A variação no diâmetro dos dois materiais ajustou-se também pelo modelo quadrático, sendo maior no começo e reduzindo a taxa de crescimento no final do período avaliado, salientando a diminuição no engrossamento causada possivelmente pelo tratamento com inoculação prévio ferimento (Figura 23).

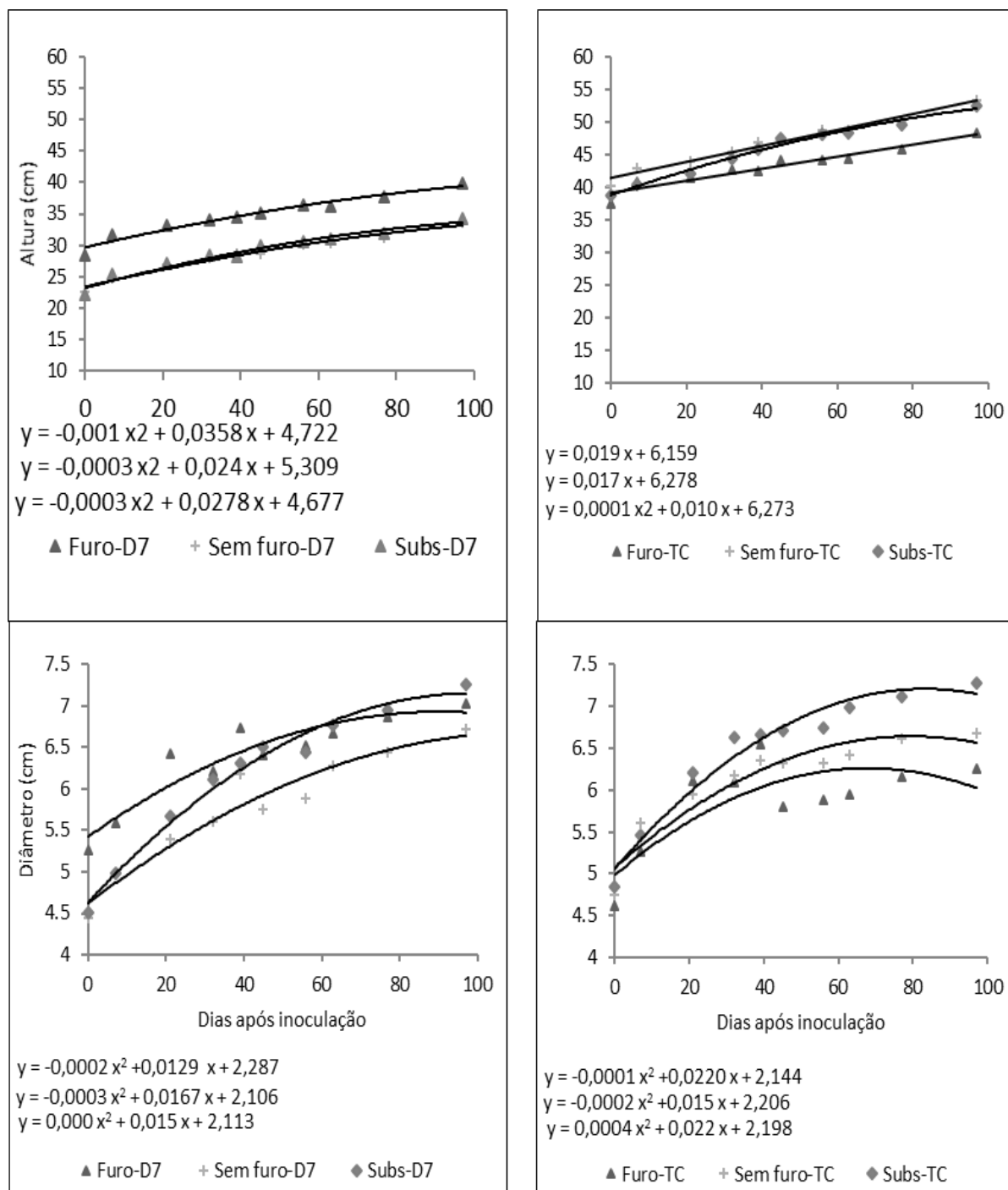


Figura 23. Regressão da análise de variância em função do tempo da interação entre o material: Toro canyon (direita) e D7 (esquerda) e o tratamento de inoculação com *P. cinnamomi* em mudas de abacateiro, no crescimento em altura (superior) e diâmetro do caule (inferior).

Taxa de Crescimento Relativo - TCR: A interação entre os materiais com o tratamento sobre a taxa de crescimento relativo, em altura e diâmetro, não foi significativa. No entanto, considerando apenas os efeitos simples, a TCR em diâmetro

do D7 foi maior que a do TC. Entre os tratamentos, a TCR da altura não diferiu, mas a do diâmetro foi menor quando o caule foi inoculado prévio fermento (Tabela 9).

Tabela 9. Resumo da análise de variância da taxa de crescimento relativo, em altura e diâmetro, de mudas de abacateiro inoculadas com *Phytophthora cinnamomi*.

Fonte de variação	Valor P	
Material (A)	Altura	Diâmetro
TC	0,0029 b	0,0037 b
D7	0,0042 a	0,0042 a
Tratamento (B)		
CF	0,0031	0,0031 b
SF	0,0036	0,0040 a
Subs.	0,004 ns	0,0047 a
Interação AxB	0,0036 ns	0,0039 ns
Material (A)	0,001	0,004
Tratamento (B)	0,161	0,040
Interação AxB	0,938	0,178
CV (%)	16,36	22,70

SF: Inoculação sem fermento; CF: Inoculação com fermento; Subs: Presença no substrato

* Para a análise estatística os dados foram transformados pela equação $1/\sqrt{x}$

O fato das plantas de D7 ficarem menores durante o experimento pode ter sido influenciado pela menor altura delas no momento da inoculação. Contrapondo o anterior, sua maior taxa de crescimento pode estar relacionada com a menor incidência da doença e ao fato de ter tido menos competição por luz entre as plantas.

Se correlacionado com a menor densidade radicular e maior área da lesão no caule nas plantas de TC, pode se inferir que a maior taxa de crescimento relativo do D7, tanto em altura como em diâmetro, pode também ser a expressão de maior habilidade para se desenvolver na presença de *Phytophthora cinnamomi*, pois o abacateiro responde ao dano causado por este patógeno com a maior produção de raízes (KELLAM; COFFEY, 1985; PLOETZ; SCHNELL; HAYNES, 2002), ou ainda com regeneração e aprofundamento do sistema radicular aonde as condições não favorecem o crescimento do inoculo (SMITH; PAUER; SHOKES, 1992).

Já a redução na taxa de crescimento do caule quando afetado pelo *Phytophthora cinnamomi* previamente ao fermento, pode ser resposta indireta da redução da eficiência metabólica afetada pela indução de metabolitos de defesa tais

como fenóis, espécies reativas de oxigênio, entre outros (FERREIRA et al., 2007; SHAH, 2009; HORBACH et al., 2011; FAWCETT; BITANCOURT, 2013;) assim como à obstrução pelo acúmulo de tilosas que ocorre durante o processo de infecção (MANSFIELD, 2012) somada com a perda de funcionalidade gradativa do tecido vascular devido à degradação dos feixes vasculares (ATTARD et al., 2008; OSSWAL et al., 2014).

Biometria da parte aérea e do sistema radicular: Após seis meses de tratamento, nas variáveis avaliadas, não houve interação entre os materiais e os tratamentos. Entretanto, entre os efeitos simples, nas plantas com inoculo no substrato, a massa seca da parte aérea foi maior em comparação com os demais tratamentos. Já entre os materiais, a densidade radicular do D7, independente do tratamento, foi maior que do TC, o que associado com a menor altura do primeiro resultou em menor relação da MSPA/MSR (Tabela 10).

Tabela 10. Avaliação de mudas de abacateiro, ‘Toro canyon’ e ‘Duke 7’ após seis meses de inoculação com *Phytophthora cinnamomi*.

	Dens. Rad.	M.S.P.A	M.S.T	Relação MSPA/MSR	V.R	M.S.R
Material (a)						
TC	0,56 b	10,19	14,45	2,37a	24,07	4,26
D7	0,98 a	8,76	14,29	1,60 b	22,81	5,53
Valor P	0,008	0,244 ns	0,954 ns	0,003	0,896 ns	0,107 ns
Tratamento (b)						
CF	0,58	7,44 b	11,97	1,72	23,64	4,53
SF	0,98	9,66 b	14,75	1,93	28,30	5,09
Subst.	0,75	11,31a	16,39	2,30	18,37	5,08
Valor P	0,094 ns	0,033	0,098 ns	0,106 ns	0,320 ns	0,699 ns
Interação a x b	0,77	9,47	14,37	1,98	23,44	4,90
Valor P	0,490 ns	0,426 ns	0,431 ns	0,969 ns	0,530 ns	0,642 ns
CV (%)	10,65	11,32	11,44	8,35	20,13	13,67

Dens. Rad. = Densidade Radicular; M.S.P.A = Massa seca da parte aérea; M.S.T = Massa seca total; V.R = Volume radicular; M.S.R = Massa seca da raiz. SF: Inoculação sem ferimento; CF: Inoculação com ferimento; Subs: Presença no substrato

* Os dados foram transformados pela formula $\sqrt{x+0,5}$

Pela etiologia da doença causada por *Phytophthora cinnamomi*, além de necrose radicular, a doença tem sido associada com diminuição da biomassa aérea,

redução da taxa de crescimento e suscetibilidade a déficit hídrico (MAUREL et al., 2001). Segundo os resultados entre os tratamentos testados, com materiais tolerantes, o desenvolvimento da lesão por *P. cinnamomi* no caule pode ser mais prejudicial no acúmulo de massa seca da parte aérea.

Embora nas mudas com inoculo no substrato se observaram escassas raízes novas e o escurecimento das mais desenvolvidas (Figura) a maior densidade radicular do D7 pode ser devido à resposta do fenótipo para superar o ataque do patógeno.

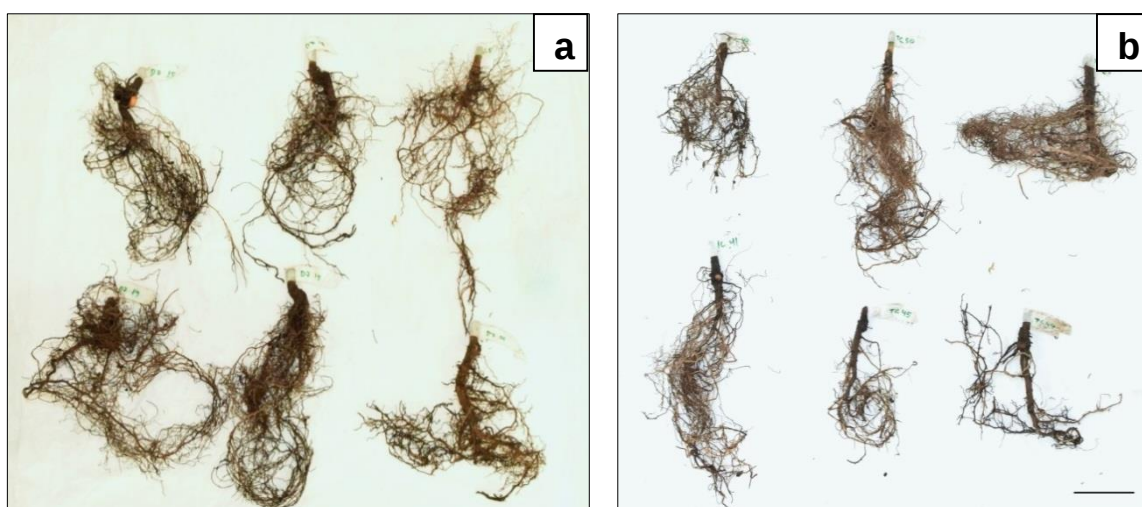


Figura 24. Sistema radicular de mudas de abacateiro após seis meses de inoculação no substrato com *Phytophthora cinnamomi*, **a.** Raiz de mudas de D7; **b.** Raiz de mudas de TC; (escala= 15 cm).

No entanto, a perda de biomassa radicular por si só não é indicativa adequada de suscetibilidade Maurel et al. (2001), pois outros sintomas como perda de biomassa aérea (PLOETZ; SCHAFFER, 1987), diâmetro e tamanho de altura da muda (INCH; PLOETZ, 2012) estão também correlacionados com o desenvolvimento de doenças em abacateiro.

3.3.5 Análise de correlação entre as variáveis biométricas e o índice de clorofila

Os parâmetros fisiológicos do aparato fotossintético estão associados com o estado nutricional e sanitário da planta e servem como ferramenta no estudo da interação planta-patógeno. (BAKER, 2004; MUSYIMI; NETONDO; OUMA, 2007;

MARTÍNEZ-FERRI et al., 2016;). Porém, no presente estudo, não houve correlação entre as variáveis biométricas, altura e diâmetro e o índice de clorofila A, B, Total ou relação A/B, 120 dias após inoculação, em nenhum dos materiais. Observou-se apenas correlação dentre as variáveis biométricas, de altura e diâmetro com a massa seca nos dois materiais, e no TC, em que o volume radicular teve correlação positiva com a MSPA (Tabela 11).

A ausência de correlação pode ser analisada em duas vias; seja porque a incidência do patógeno não afetou o equilíbrio fotossintético das clorofilas, ou porque este último não é um parâmetro sensível para o estudo desta doença nos estádios iniciais da interação.

Pela análise ao longo do tempo referida anteriormente, em que não houve diferença entre o tratamento para a clorofila, mas sim na F_v/F_m fotossintética das plantas inoculadas no substrato, indica um possível aumento da capacidade fotossintética para superar a limitação na redução do dano radicular, porém, isto não se refletiu na acumulação de massa seca.

Tabela 11. Análise de correlação de Pearson entre as variáveis biométricas avaliadas na incidência da doença causada por *Phytophthora cinnamomi* na progênie dos abacateiros ‘Toro canyon’ e ‘Duke 7’.

		M.F.R	D.R	M.S.P.A	M.S.R	M.S.T	MSPA/MSR	chl A	chl B	chl Total	Chl a/b	Alt.	Diam.
		0,662	-0,337	0,797	0,906	0,851	0,156	0,615	0,481	0,559	-0,365	0,893	0,724
Toro canyon	V.R	0,052	0,375	0,010	0,001	0,004	0,689	0,078	0,190	0,117	0,333	0,001	0,027
	M.F.R		0,376	0,346	0,760	0,460	-0,353	0,422	0,456	0,443	-0,399	0,495	0,455
			0,318	0,362	0,018	0,213	0,352	0,257	0,217	0,232	0,287	0,175	0,218
	D.R			-0,488	-0,206	-0,435	-0,505	-0,273	-0,045	-0,170	-0,026	-0,541	-0,442
				0,183	0,595	0,242	0,166	0,477	0,908	0,662	0,948	0,132	0,234
	M.S.P.A				0,821	0,990	0,650	0,372	0,131	0,264	0,024	0,920	0,839
					0,007	0,000	0,058	0,324	0,737	0,493	0,952	0,000	0,005
	M.S.R					0,893	0,117	0,404	0,261	0,342	-0,119	0,879	0,844
						0,001	0,765	0,280	0,498	0,368	0,761	0,002	0,004
	M.S.T						0,540	0,393	0,167	0,292	-0,011	0,941	0,869
							0,133	0,295	0,667	0,446	0,978	0,000	0,002
	MSPA/ MSR							0,028	-0,203	-0,080	0,275	0,415	0,400
								0,943	0,600	0,839	0,474	0,266	0,286
	chl A								0,957	0,991	-0,904	0,617	0,172
									0,000	0,000	0,001	0,077	0,659
	chl B									0,987	-0,982	0,398	-0,044
										0,000	0,000	0,289	0,910
	chl Total										-0,950	0,522	0,073
											0,000	0,150	0,852
	Chl a/b											-0,257	0,158
												0,505	0,684
	Alt.												0,831
													0,006

Duke 7		M.F.R	D.R	M.S.P.A	M.S.R	M.S.T	MSPA/MSR	chl A	chl B	chl Total	Chl a/b	Alt.	Diam.
	V.R	0,578	-0,314	0,648	0,782	0,710	-0,272	0,008	-0,082	-0,033	0,203	0,863	0,640
		0,103	0,411	0,059	0,013	0,032	0,479	0,984	0,834	0,933	0,601	0,003	0,063
	M.F.R		0,535	0,614	0,702	0,658	-0,185	0,472	0,452	0,473	-0,294	0,593	0,559
			0,138	0,078	0,035	0,054	0,634	0,200	0,222	0,198	0,442	0,093	0,117
	D.R			-0,067	-0,063	-0,067	-0,023	0,432	0,465	0,456	-0,383	-0,238	-0,106
				0,863	0,872	0,864	0,953	0,246	0,207	0,217	0,309	0,537	0,786
	M.S.P.A				0,935	0,991	0,181	0,125	0,086	0,110	-0,023	0,862	0,923
					0,000	0,000	0,641	0,748	0,827	0,778	0,954	0,003	0,000
	M.S.R					0,975	-0,171	-0,003	-0,028	-0,015	0,092	0,958	0,952
						0,000	0,659	0,993	0,943	0,971	0,814	0,000	0,000
	M.S.T						0,047	0,078	0,043	0,064	0,021	0,913	0,949
							0,904	0,843	0,913	0,871	0,956	0,001	0,000
	MSPA/MSR							0,445	0,410	0,439	-0,401	-0,260	-0,134
								0,230	0,273	0,238	0,285	0,500	0,731
	chl A								0,916	0,983	-0,721	-0,131	-0,146
									0,001	0,000	0,028	0,737	0,708
	chl B									0,974	-0,935	-0,224	-0,199
										0,000	0,000	0,562	0,608
	chl Total										-0,834	-0,176	-0,173
											0,005	0,650	0,656
	Chl a/b											0,320	0,248
												0,400	0,520
	Alt.												0,930
													0,000

VR: volume de raiz; MSR: Massa seca da raiz; MFR: Massa fresca da raiz; DR: Densidade radicular; MSPA: Massa seca da parte aérea; MST: Massa seca total; chl: Clorofila; Alt: Altura; Diam.: Diâmetro; verde: correlação positiva; rosa: correlação negativa.

3.3.6 Alterações histológicas do caule na região de inoculação por microscopia ótica

Em ambos os materiais estudados, na fase de muda, observaram-se diferenças histológicas na espessura do floema, xilema e no diâmetro dos vasos do xilema secundário (D.V.X.S). O caule dos dois materiais caracterizou-se pela ausência de súber; a espessura da epiderme, de camada unisseriada, maior no TC do que no D7, sendo em média de 19,18 e 13,58 μm , respectivamente.

A espessura da camada do floema foi maior no D7, mas pelo contrário, a espessura do xilema primário e o D.V.X.S foi maior no TC.

As variações causadas pelo ferimento diferiram entre os materiais. Apenas a espessura da epiderme no TC aumentou enquanto que o floema e o DVXS foram menores quando comparado com o tecido intacto. No D7 os tecidos externos, epiderme e floema não variaram significativamente, enquanto que o xilema e o DVXS decresceram.

Contrário ao anterior, na presença do patógeno, a espessura da epiderme, do floema e o xilema, aumentou na presença do *P. cinnamomi* (Tabela 12).

Tabela 12. Análise de variância entre o material de abacateiro e a inoculação no caule com *Phytophthora cinnamomi* sobre as alterações na região da epiderme, floema e xilema.

Efeito do material				
Fonte de variação	Epiderme	Floema	Xilema	D.V X.S
TC	19,18a	223,63b	264,98a	40,35a
D7	13,58b	323,77a	212,57b	32,77b
P (0,05)	0,011	0,002	0,018	<0.001

Efeito do ferimento – TC				
Fonte de variação	Epiderme	Floema	Xilema	D.V X.S
TC intacto	19,18b	223,63a	264,98ns	40,35a
TC com ferimento	24,26a	155,39b	236,63	30,57b
P (0,05)	0,032	0,002	0,128	<0.001

Ferimento vs patógeno – D7				
Fonte de variação	Epiderme	Floema	Xilema	D.V X.S
D7 com ferimento	15,21a	344,15a	177,36b	27,78b
D7 com patógeno	12,37b	111,47b	281,75a	41,58a
P (0,05)	0,007	<0.001	<0.001	<0.001

Efeito do ferimento-D7				
Fonte de variação	Epiderme	Floema	Xilema	D.V X.S
D7 sem ferimento	13,58ns	323,77ns	212,57a	32,77a
D7 com ferimento	15,21	344,15	177,36b	27,78b
P (0,05)	0,194	0,550	0,029	0,003

Efeito do patógeno-D7				
Fonte de variação	Epiderme	Floema	Xilema	D.V X.S
D7 intacto	12,37b	111,47b	281,75b	41,58a
D7 com patógeno	20,82a	315,03a	305,03a	38,27b
P (0,05)	0,001	<0.001	<0.001	0,117

D.V.X.S= Diâmetro médio dos vasos do xilema secundário.

Característico dos patógenos hemibiotróficos, tais como *Phytophthora cinnamomi*, o mesmo penetra inicialmente no tecido e posteriormente, numa segunda fase, inicia o processo de necrose (HARDHAM, 2001; LAPIN; VAN DEN ACKERVEKEN, 2013), sendo que a penetração do patógeno pode ocorrer nas primeiras horas de contato com a planta (O’GARA et al., 2015; RUIZ GÓMEZ et al. 2015) e pode desenvolver lesões necróticas ou colonizar sem degradar o tecido, segundo as condições ambientais (COLLINS et al., 2012; SHEARER; CRANE, 2012).

Baseado na análise anatômica do tecido do caule sugere-se que, nessa fase inicial, o patógeno coloniza e se estabelece principalmente no tecido vascular, por meio de hifas (Figura 25 a,b,c) tal como referenciado por Ruiz Gómez et al. (2015),

onde posteriormente, na fase necrotrófica, inicia a degradação de paredes celulares e o colapso das estruturas.

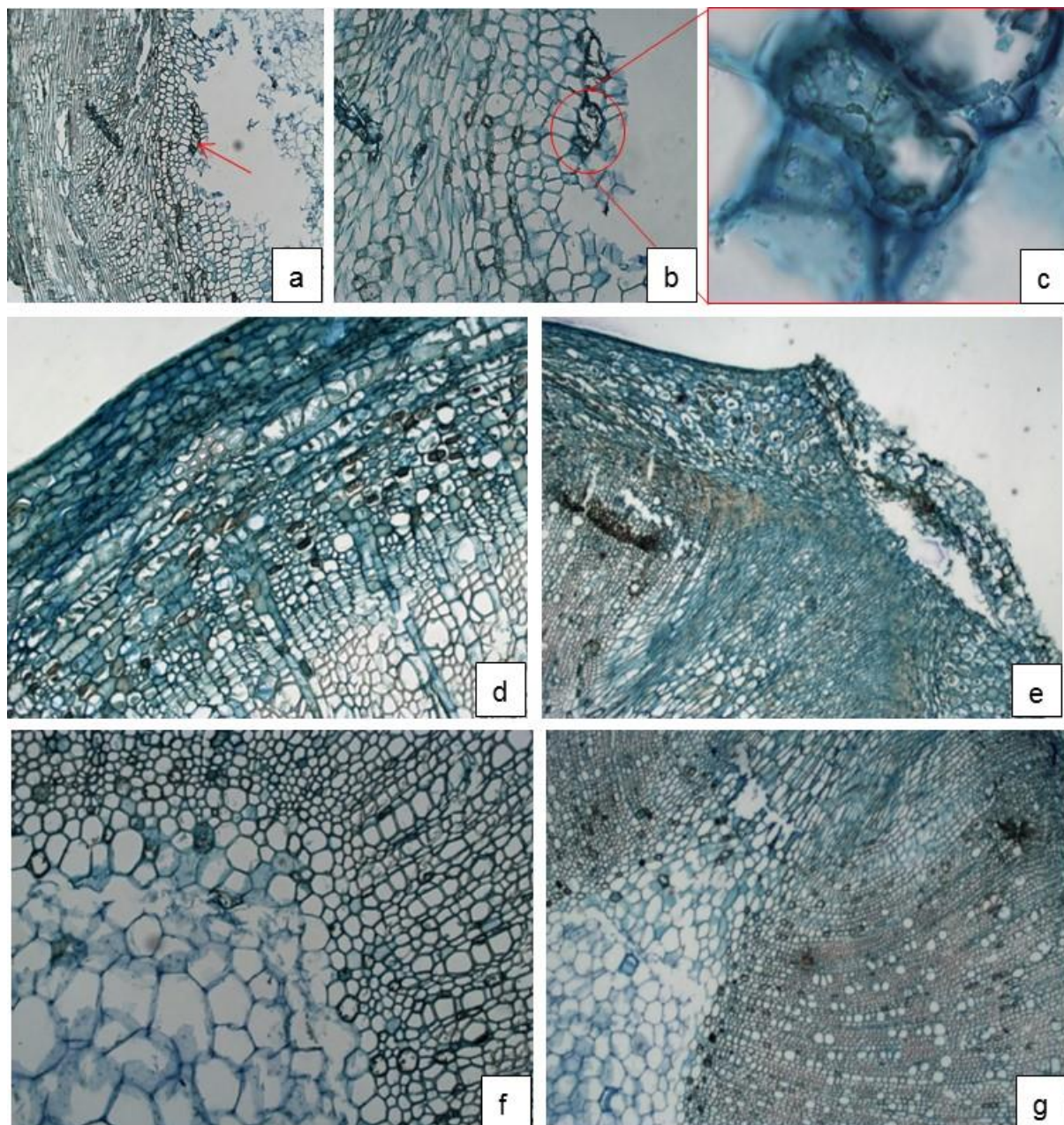


Figura 25. Região de xilema em caule de abacateiro com presença de micélio de *Phytophthora cinnamomi* com aumento de 40x (a), 100x (b) e 400x (c). A seta vermelha indica a região de localização do micélio, assim como tecido intacto (d, f) e tecido inoculado (e, g).

Nos primeiros dias após inoculação, em consequência da interação entre o patógeno e a planta ocorre divisão acelerada das células circundantes, tal como

referido por Moralejo, García-Muñoz e Descals (2009) na interação de *P. cinnamomi* e *P. ramorum*, especificamente das células do parênquima medular e do xilema para regenerar a região afetada pela colonização, pois o floema e a epiderme estão menos envolvidos.

Já após 45 dias do tratamento no caule, observou-se degradação do tecido circundante ao ponto de infecção, principalmente na epiderme e com menor severidade no xilema e parênquima medular (Figura). No desenvolvimento da lesão no caule, sustentado em vários estudos, sabe-se que a severidade e tamanho da área necrosada são variáveis, podendo ou não estar acompanhada de sintomas tais como exsudação (MBAKA et al., 2009). O aparecimento do sintoma pode variar entre poucas horas até vários dias, dependendo da patogenicidade do isolado inoculado, tecido afetado e grau de suscetibilidade da espécie (ZENTMYER; STOREY, 1961; O'GARA et al., 1997; RUIZ GÓMEZ et al., 2015).



Figura 26. Região de inoculação com *Phytophthora cinnamomi* em caule de mudas de abacateiro após 45 dias. Secção transversal de Toro canyon (a) e Duke 7 (b); vista externa na epiderme (c) e corte longitudinal (d) da lesão.

Segundo Osswal et al. (2014) as variações histológicas causadas pelo *Phytophthora* dependem do tecido colonizado e da liberação de toxinas, assim por exemplo no abacateiro posterior à infecção primária de *P. cinnamomi* através das raízes pode ocorrer o avanço pelo câmbio, floema e xilema, dependendo da existência das condições para o desenvolvimento da doença.

Por sua vez, Tippet et al. (1983) e Tippet e Hill (1984) observaram, em *Eucalyptus marginata*, que o desenvolvimento da lesão em caule lignificado invadiu os tecidos, principalmente o floema secundário; e na raiz de *Quercus ilex*, Redondo et al. (2015) observaram padrão diferente de colonização dependendo do tipo de raiz, sendo comum o desenvolvimento majoritário no floema, colonização intracelular e formação de haustório sem degradação celular, na fase inicial de inoculação.

3.3.7 Alterações histológicas na região de inoculação por microscopia de varredura

A avaliação por microscopia ótica e diferenciação das estruturas de *P. cinnamomi* em tecido vegetal é difícil, devido principalmente aos corantes histológicos utilizados (LI et al., 2014). Portanto, complementando a análise por microscopia ótica, usando microscopia eletrônica de transmissão, na região de inoculação e em tecido intacto, observaram-se algumas características no caule dos materiais D7 e TC (Figura 27) na interação com o patógeno.

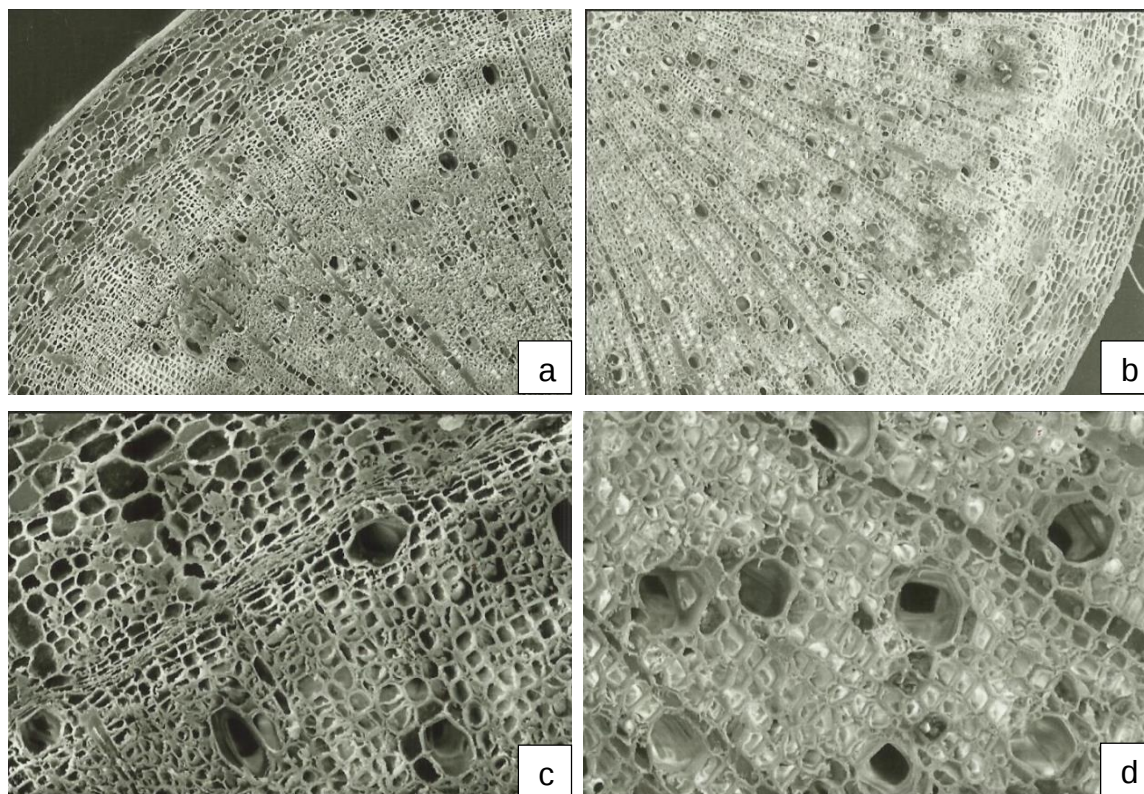


Figura 27. Eletromicrografia de varredura da secção transversal do caule de mudas de abacateiro 'Toro canyon' (esquerda) e 'Duke 7' (direita).

Na fase inicial do contato do patógeno com o tecido ocorre a fase biotrófica, de reconhecimento e estabelecimento no tecido através do crescimento de micélio, formação de haustórios e liberação enzimática (ATTARD et al., 2008; YOSHIDA; SHIRASU, 2012), podendo ocorrer a degradação das camadas externas da epiderme e do floema, tal como observado na Figura 28, similar ao observado por Inch e Ploetz (2012) no caule de mudas de abacateiro afetadas por *Rafaellea lauricola*.

Observou-se também abundante presença do micélio (Figura 28 a, b) na região do tecido necrosado com sua consequente perda de estrutura (Figura 29 d), assim como acúmulo regular de conteúdo granular (Figura 28 c), cujo tipo e função deste não se conhecem, pois são necessários testes específicos para sua identificação.

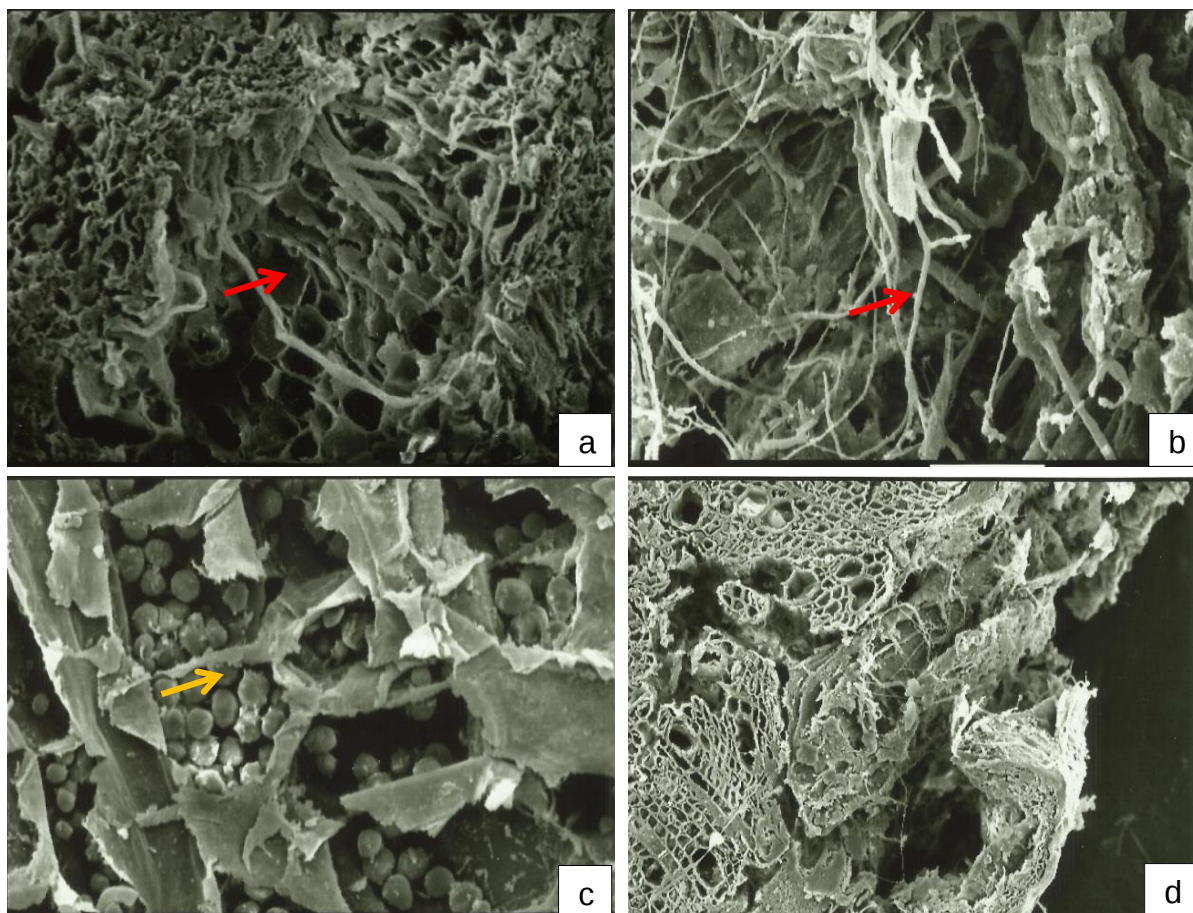


Figura 28. Eletromicrografia de varredura na região da base do caule de mudas de abacateiro 'Toro canyon' (Esquerda) e 'Duke 7' (direita) sob incidência de *P. cinnamomi* 15 dias após a inoculação, observando-se abundante micélio (seta vermelha) (a, b) e presença de grãos de polissacarídeos (seta amarela) nos vasos do xilema (c), vista geral da região dos sintomas (d).

Embora poucos estudos histológicos relatam a interação do *Phytophthora cinnamomi* com plantas lenhosas, o observado nas anteriores eletromicrografias, assemelha-se das respostas comuns como a colonização e proliferação de estruturas intracelulares circundando o tecido desorganizado e células destruídas tal como relatado em tecido de *Quercus ilex* (SHEARER; CRANE, 2012; REDONDO et al., 2015; RUIZ GÓMEZ et al., 2015). Por sua vez, tal como observado neste estudo, o acúmulo de conteúdo granular, visível no tecido vascular, segundo Mansfield (2012) é desencadeado como resposta para proteção contra entrada de patógenos, desidratação entre outras.

3.4 Conclusões

Mudas de abacateiro dos materiais Duke 7 e Toro canyon obtidas por semente toleraram a presença de *Phytophthora cinnamomi* no substrato.

O estabelecimento do patógeno no caule e sucedido na fase inicial (15 dias) pelo rápido aumento da divisão celular na região de afetação, porém, com o tempo o patógeno afeta a integridade das estruturas do tecido.

O aumento do desenvolvimento radicular e da Fv/Fm pode ser uma resposta de tolerância da planta diante da presença do *Phytophthora cinnamomi*.

O índice de clorofila não se mostrou sensível para avaliação das fases iniciais do estabelecimento do patógeno na planta.

A sensibilidade das mudas de abacateiro inoculadas no caule diferiu entre os materiais, mas não foi afetada pelo ferimento mecânico, o que suporta a capacidade do *P. cinnamomi* de atravessar aberturas naturais do caule.

3.5 Referências

ALMARAZ-SÁNCHEZ, A.; ALVARADO-ROSALES, D.; SAAVEDRA-ROMERO, L. D. L. Trameo de *Phytophthora cinnamomi* en bosque de encino con dos especies ornamentales e inducción de su esporulación. **Revista Chapingo**, Chapingo, v. 19, n. 1, p. 5–12, 2013.

ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Photosynthesis under stressful environments: an overview. **Photosynthetica**, Prague, v. 51, n. 2, p. 163–190, 2013.

ATTARD, A.; Gourgues, M.; Galiana, E.; Panabières, F.; Ponchet, M.; Keller, H. Strategies of attack and defense in plant-oomycete interactions, accentuated for *Phytophthora parasitica* Dastur (syn. *P. Nicotianae* Breda de Haan). **Journal of Plant Physiology**, Muenchen, v. 165, n. 1, p. 83–94, 2008.

ATUCHA, A.; EMMETT, B.; BAUERLE, T. L. Growth rate of fine root systems influences rootstock tolerance to replant disease. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 376, n. 1, p. 337–346, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11104-013-1977-5>>.

BAETZ, U.; MARTINOIA, E. Root exudates: the hidden part of plant defense. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 19, n. 2, p. 90–8, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2013.11.006>>.

BAKER, N. R.; ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 403, p. 1607–1621, 2004.

BAURIEGEL, E.; HERPPICH, W. Hyperspectral and chlorophyll fluorescence imaging for early detection of plant diseases, with special reference to fusarium spec. infections on wheat. **Agriculture**, Montreal, v. 4, n. 1, p. 32–57, 2014.

BOTHA, T.; WEHNER, F. C.; KOTZÉ, J. M. Screening of avocado rootstocks for tolerance to *Phytophthora cinnamomi* with various *in vitro* techniques and the possible role of amino acids in resistance. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 275, p. 737–744, 1990. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.1990.275.92>>.

BRAZZAVILLE, D.; PHYTOPATHOLOGIE, D. Application de la technique du marquage fluorescent à la détermination du comportement sexuel du *Phytophthora palmivora*. **Cahiers ORSTOM. Série Biologie**, Montpellier, v. 20, p. 59–61, 1973.

CANADAY, C. H.; SCHMITTHENNER, A. F. Effects of chloride and ammonium salts on the incidence of *Phytophthora* root and stem rot of soybean. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, , n. 6, p. 758–765, 2010.

CHAO, C. T.; MENGE., J. Host-parasite interactions between avocado rootstocks and *Phytophthora cinnamomi*. In: CALIFORNIA AVOCADO RESEARCH SYMPOSIUM, 2002, Riverside. **Anais...** Riverside: California Avocado Commission, 2002. p. 37–39 Disponível em: <http://www.avocadosource.com/arac/symposium_2001/chao.pdf>

COFFEY, M. D. *Phytophthora* root rot of avocado. In: KUMAR, J.; CHAUBE, H. S.; SINGH, U. S.; MUKHOPADHYAY, A. N. (Eds.). **Plant diseases of international importance. Diseases of Fruit Crops**. New Jersey: Englewood Cliffs – Prentice-Hall, v. 3, p. 423–444, 1992.

COLLINS, S.; McCOMB, J. A.; HOWARD, K.; SHEARER, B. L.; COLQUHOUN, I. J.; HARDY, G. E. St. J. The long-term survival of *Phytophthora cinnamomi* in mature *Banksia grandis* killed by the pathogen. **Forest Pathology**, Berlin, v. 42, n. 1, p. 28–36, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0329.2011.00718.x>>.

COOK, R. E. Clonal plant populations: a knowledge of clonal structure can affect the interpretation of data in a broad range of ecological and evolutionary studies. **American Scientist**, Durham, v. 71, n. 3, p. 244–253, 1983.

CRONE, M.; McCOMB, J. A.; O'BRIEN, P. A.; HARDY, G. E. Survival of *Phytophthora cinnamomi* as oospores, stromata, and thick-walled chlamydospores in roots of symptomatic and asymptomatic annual and herbaceous perennial plant species. **Fungal Biology**, London, v. 117, n. 2, p. 112–123, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2012.12.004>>.

DOUHAN, G. W.; McKEE, B.; POND, E. Screening and evaluation of new rootstocks with resistance to *Phytophthora cinnamomi* 2005 – continuing project : year 15 of 20. In: CALIFORNIA AVOCADO RESEARCH SYMPOSIUM, 2006, Riverside. **Anais...** Riverside: California Avocado Commission, 2006. p. 81–86.

DOUHAN, G. W.; FULLER, E.; McKEE, B.; POND, E. Genetic diversity analysis of avocado (*Persea americana* Miller) rootstocks selected under greenhouse conditions for tolerance to phytophthora root rot caused by *Phytophthora cinnamomi*. **Euphytica**, Dordrecht, v. 182, n. 2, p. 209–217, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10681-011-0433-y>>.

ENGELBRECHT, J.; VAN DEN BERG, N. Expression of defence-related genes against *Phytophthora cinnamomi* in five avocado rootstocks. **South African Journal of Science**, Lynnwood Ridge, v. 109, n. 11–12, p. 1–8, 2013.

FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. **Fungal databases, systematic mycology and microbiology laboratory**. 2015. Disponível em: <<http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>>. Acesso em: 25 abr. 2015.

FAWCETT, H. S.; BITANCOURT, A. A. Occurrence, pathogenicity, and temperature relations of *Phytophthora* species on citrus in Brazil and other South American countries. **Citrus Research and Technology**, Cordeiropolis, v. 34, n. 2, p. 75–88, 2013.

FERNANDEZ NOGUEIRA, C.; ROOYEN, Z. V.; KÖHNE, S. Reasons for the use of clonal avocado rootstocks around the world. In: WORLD AVOCADO CONGRESS, 7., 2011, Cairns, Australia. **Anais...** Cairns, Avocados Australia, 2011. CD-ROM.

FERREIRA, R. B.; MONTEIRO, S.; FREITAS, R.; SANTOS, C. N.; CHEN, Z.; BATISTA, L. M.; DUARTE, J.; BORGES, A.; TEIXEIRA, A. R. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. **Molecular Plant Pathology**, Chichester, v. 8 n. 5, p. 677–700, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00419.x>>.

FROLICH, E. F.; PLATT, R. G. Use of the etiolation technique in rooting avocado cuttings. **California Avocado Society. Yearbook**, Temecula, v. 55, p. 97–109, 1971.

FROLICH, E. F. Rooting Guatemalan avocado cuttings. **California Avocado Society. Yearbook**, Temecula, v. 36, p. 136–138, 1951.

GABOR, B. K. Comparison of Rapid Methods for Evaluating Resistance to *Phytophthora cinnamomi* in Avocado Rootstocks. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 75, n. 2, p. 118, 1991.

HARDHAM, A. R. The cell biology behind Phytophthora pathogenicity. **Australasian Plant Pathology**, Dordrecht, v. 30, n. 2, p. 91–98, 2001.

HARDHAM, A. R. *Phytophthora cinnamomi*. **Molecular Plant Pathology**, West Sussex, v. 6, n. 6, p. 589–604, 2005.

HOFFMANN, R. Estimativas das elasticidades-renda de várias categorias de despesa e de consumo, especialmente alimentos, no brasil, com base na POF de 2008-2009. **Revista de Economia Agrícola**, São Paulo, v. 57, n. 2, p. 49–62, 2010.

HORBACH, R.; NAVARRO-QUESADA, A. R.; KNOGGE, W.; DEISING, H. B. When and how to kill a plant cell: infection strategies of plant pathogenic fungi. **Journal of Plant Physiology**, Muenchen, v. 168, n. 1, p. 51–62, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2010.06.014>>.

HÜIBERLI, D.; TOMMERUP, I. C.; HARDY, G. E. S. J. False-negative isolations or absence of lesions may cause mis-diagnosis of diseased plants infected with *Phytophthora cinnamomi*. **Australasian Plant Pathology**, Dordrecht, v. 29, n. 3, p. 164–169, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1071/AP00029>>

INCH, S. A.; PLOETZ, R. C. Impact of laurel wilt, caused by *Raffaelea lauricola*, on xylem function in avocado, *Persea americana*. **Forest Pathology**, Berlin, v. 42, n. 3, p. 239–245, 2012.

JEFFERS, S. N.; MARTIN, S. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and pythium species. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 70, n. 11, p. 1038–1043, 1986.

JUDELSON, H. S.; BLANCO, F. A. The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 3, n. 1, p. 47–58, 2005.

KELLAM, M. K.; COFFEY, M. D. Quantitative comparison of the resistance to *Phytophthora* root rot in three avocado rootstocks. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 75, p. 230–234, 1985. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1094/Phyto-75-230>>.

KRAUSE, G. H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis : the basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 42, p. 313–349, 1991. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.001525>>.

KREMER-KÖHNE, S.; VAN ROOYEN, Z.; KÖHNE, J. Avocado rootstock evaluation techniques over the last 30 years. In: WORLD AVOCADO CONGRESS, 7., 2011, Cairns. **Anais...** Cairns: Avocados Australia, 2011. CD-ROM.

LAPIN, D.; VAN DEN ACKERVEKEN, G. Susceptibility to plant disease: more than a failure of host immunity. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 18, n. 10, p. 546–54, 2013.

LI, A. Y.; CRONE, M.; ADAMS, P. J.; FENWICK, S. G.; HARDY, G. E. S. J.; WILLIAMS, N. The microscopic examination of *Phytophthora cinnamomi* in plant tissues using fluorescent in situ hybridization. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 162, n. 11–12, p. 747–757, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/jph.12257>>.

MANSFIELD, J. W. Antimicrobial compounds and resistance. In: SLUSARENKO, A. J.; FRASER, R. S.; LOON, L. C. (Eds.). **Mechanisms of resistance to plant diseases**. New York: Springer Science & Business Media, 2012. p. 325–370.

MARTÍNEZ-FERRI, E.; ZUMAQUERO, A.; ARIZA, M. T.; BARCELÓ, A.; PLIEGO, C. Nondestructive detection of white root rot disease in avocado rootstocks by leaf chlorophyll fluorescence. **Plant Disease**, St. Paul, v. 100, n. 1, p. 49–58, 2016.

MATSUBARA, S.; CHEN, Y.; CALIANDRO, R.; GOVINDJEE, G.; CLEGG, R. M. Photosystem II fluorescence lifetime imaging in avocado leaves: contributions of the lutein-epoxide and violaxanthin cycles to fluorescence quenching. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, Amsterdam, v. 104, n. 1–2, p. 271–284, 2011.

MAUREL, M.; ROBIN, C.; CAPRON, G.; DESPREZ-LOUSTAU, M. L. Effects of root damage associated with *Phytophthora cinnamomi* on water relations, biomass accumulation, mineral nutrition and vulnerability to water deficit of five oak and chestnut species. **Forest Pathology**, Berlin, v. 31, n. 6, p. 353–369, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1439-0329.2001.00258.x>>.

MTAKA, J. N.; WAMUCHO, L. S.; TUROOP, L.; WAIGANJO, M. M. The incidence and distribution of *Phytophthora cinnamomi* Rands on macadamia in Kenya. **Journal of Animal & Plant Sciences**, Nairobi, v. 4, n. 1, p. 289–297, 2009.

MORALEJO, E.; GARCÍA-MUÑOZ, J. A.; DESCALS, E. Susceptibility of Iberian trees to *Phytophthora ramorum* and *P.cinnamomi*. **Plant Pathology**, Dordrecht, v. 58, n. 2, p. 271–283, 2009.

MUSYIMI, D. M.; NETONDO, G. W.; OUMA, G. Growth of avocado plants under saline conditions. **International Journal of Fruit Science**, New York, v. 7, n. 1, p. 59–75, 2007.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Statistics division**. 2013. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>>. Acesso em: 12 out. 2015.

O'GARA, E. K.; HOWARD, K.; McCOMB, J.; COLQUHOUN, I. J.; HARDY, G. E. S. J. Penetration of suberized periderm of a woody host by *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, West Sussex, v. 64, n. 1, p. 207–215, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/ppa.12244>>.

O'GARA, E.; McCOMB, J. A.; COLQUHOUN, I. J.; HARDY, G. E. S. J. The infection of non-wounded and wounded periderm tissue at the lower stem of *Eucalyptus marginata* by zoospores of *Phytophthora cinnamomi*, in a rehabilitated bauxite mine. **Australasian Plant Pathology**, Dordrecht, v. 26, n. 3, p. 135–141, 1997.

O'BRIEN, P. A.; WILLIAMS, N.; HARDY, G. E. S. Detecting *Phytophthora*. **Critical Reviews in Microbiology**, Oxfordshire, v. 35, n. 3, p. 169–81, 2009.

OQUIST, G.; WASS, R. A portable, microprocessor operated instrument for measuring chlorophyll fluorescence kinetics in stress physiology. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 73, n. 2, p. 211–217, 1988.

OßWALD, W.; FLEISCHMANN, F.; RIGLING, D.; COELHO, A. C.; CRAVADOR, A.; DIEZ, J.; DALIO, R. J.; HORTA JUNG, M.; PFANZ, H.; ROBIN, C.; SIPOS, G.; SOLLA, A.; CECHE, T.; CHAMBERY, A.; DIAMANDIS, S.; HANSEN, E.; JUNG, T.; ORLIKOWSKI, L. B.; PARKE, J.; PROSPERO, S.; WERRES, S. Strategies of attack and defence in woody plant–Phytophthora interactions. **Forest Pathology**, Berlin, v. 44, n. 3, p. 169–190, 2014.

OYARCE, P.; GUROVICH, L. Electrical signals in avocado trees: responses to light and water availability conditions. **Plant signaling & Behavior**, Philadelphia, v. 5, n. 1, p. 34–41, 2010.

PALLARDY, S. G. Photosynthesis. In: PALLARDY, S. G. (Ed.). **Physiology of woody plants**. 3. ed. Burlington: Academic Press, 2010. p. 107–168.

PAPAGEORGIOU, G.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; STAMATAKIS, K. The fast and slow kinetics of chlorophyll a fluorescence induction in plants, algae and cyanobacteria: a viewpoint. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 94, n. 2–3, p. 275–290, 2007.

PLOETZ, R. C.; SCHAFFER, B. Effects of flooding and Phytophthora root rot on photosynthetic characteristics of avocado. **Proceedings of Florida State Horticulture Society**, Lake Alfred, v. 100, p. 290–294, 1987.

PLOETZ, R.; SCHNELL, R. J.; HAYNES, J. Variable response of open-pollinated seedling progeny of avocado to *Phytophthora* root rot. **Phytoparasitica**, Dordrecht, v. 30, n. 3, p. 262–268, 2002.

REDONDO, M. Á.; PÉREZ-SIERRA, A.; ABAD-CAMPOS, P.; TORRES, L.; SOLLA, A.; REIG-ARMIÑANA, J.; GARCÍA-BREIJO, F. Histology of *Quercus ilex* roots during infection by *Phytophthora cinnamomi*. **Trees**, West Sussex, v. 29, n. 6, p. 1943–1957, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00468-015-1275-3>>.

REED, S.; SCHNELL, R.; MOORE, J. M.; DUNN, C. Chlorophyll a + b content and chlorophyll fluorescence in avocado. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 4, n. 4, p. 29–36, 2012.

REEKSTING, B. J.; TAYLOR, N. J.; VAN DEN BERG, N. Flooding and *Phytophthora cinnamomi*: Effects on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in shoots of non-grafted *Persea americana* (Mill.) rootstocks differing in tolerance to *Phytophthora* root rot. **South African Journal of Botany**, Amsterdam, v. 95, p. 40–53, 2014.

RIBEIRO, O. K. A historical perspective of *Phytophthora*. In: LAMOUR, K. (Ed.). ***Phytophthora: A global perspective***. Knoxville: CABI Plant Protection Series, 2013. p. 244.

RUIZ GÓMEZ, F. J.; NAVARRO-CERRILLO, R. M.; SÁNCHEZ-CUESTA, R., PÉREZ-DE-LUQUE, A. Histopathology of infection and colonization of *Quercus ilex* fine roots by *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, West Sussex, v. 64, n. 3, p. 605–616, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/ppa.12310>>.

SERRANO, M. S.; FERNÁNDEZ-REBOLLO, P.; DE VITA, P.; M. SÁNCHEZ, E. Calcium mineral nutrition increases the tolerance of *Quercus ilex* to *Phytophthora* root disease affecting oak rangeland ecosystems in Spain. **Agroforestry Systems**, Dordrecht, v. 87, n. 1, p. 173–179, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10457-012-9533-5>>.

SGHAIER-HAMMAMI, B.; VALERO-GALVÁN, J.; ROMERO-RODRÍGUEZ, M. C.; NAVARRO-CERRILLO, R. M.; ABDELLY, C.; JORRÍN-NOVO, J. Physiological and proteomics analyses of Holm oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota* [Desf.] Samp.) responses to *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Physiology and Biochemistry: PPB/Société Française de Physiologie Végétale**, Issy les Moulineaux, v. 71, p. 191–202, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.06.030>>.

SHAH, J. Plants under attack : systemic signals in defence. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 459–464, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2009.05.011>>.

SHEARER, B. L.; CRANE, C. E. *Phytophthora cinnamomi* visible necrotic lesion-colonisation relationships in native flora. **Australasian Plant Pathology**, Dordrecht, v. 41, n. 6, p. 633–644, 2012.

SMITH, D. H.; PAUER, G. D. C.; SHOKES, F. M. **Plant diseases of international importance: diseases of vegetables and oil seed crops**. New Jersey: Prentice-Hall Inc., 1992.

SUGIMOTO, T.; AINO, M.; SUGIMOTO, M.; WATANABE, K. Reduction of *Phytophthora* stem rot disease on soybeans by the application of CaCl_2 and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 153, n. 9, p. 536–543, 2005.

SUGIMOTO, T.; WATANABE, K.; FURIKI, M.; WALKER, D.R.; YOSHIDA, S.; AINO, M.; KANTO, T.; IRIE, K. The effect of potassium nitrate on the reduction of *Phytophthora* stem rot disease of soybeans, the growth rate and zoospore release of *Phytophthora sojae*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 157, n. 6, p. 379–389, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0434.2008.01500.x>>.

TIPPETT, J. T.; HILL, T. C. Role of periderm in resistance of *Eucalyptus marginata* roots against *Phytophthora cinnamomi*. **Forest Pathology**, Berlin, v. 14, n. 7, p. 431–439, 1984.

TIPPETT, J. T.; SHEA, S. R.; HILL, T. C.; SHEARER, B. L. Development of lesions caused by *Phytophthora cinnamomi* in the secondary phloem of *Eucalyptus marginata*. **Australian Journal of Botany**, Clayton, v. 31, n. 2, p. 197–210, 1983.

VAN WEST, P.; MORRIS, B. M.; REID, B.; APPIAH, A. A.; OSBORNE, M. C.; CAMPBELL, T. A.; SHEPHERD, S. J. Oomycete plant pathogens use electric fields to target roots. **Molecular Plant – Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 15, n. 8, p. 790–798, 2002.

VAZ, A. B.; LUZ, E. D. M. N.; SILVA, S. D. V. M.; OLIVEIRA, M. L. Aspectos histopatológicos da interação *Phytophthora palmivora* com a pupunheira. **Tropical Plant Pathology**, Heidelberg, v. 36, n. 4, p. 259–263, 2011.

VILLAFÁN VIDALES, K. B.; AYALA ORTIZ, D. A. Responsabilidad social de las empresas agrícolas y agroindustriales aguacateras de Uruapan, Michoacán, y sus implicaciones en la competitividad. **Contaduría y Administración**, Ciudad de México, v. 59, n. 4, p. 223–251, 2014.

VINCENT, C.; ROWLAND, D. L.; SCHAFFER, B. The potential for primed acclimation in papaya (*Carica papaya* L.): Determination of critical water deficit thresholds and physiological response variables. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 194, p. 344–352, 2015.

WESSELS, H. *In vitro* Clonal Propagation of Avocado Rootstocks. **South African Avocado Growers' Association Yearbook**, Limpopo, v. 19, p. 59–60, 1996.

WHILEY, A. W. **Rootstock improvement for the Australian avocado industry phase III**. Sydney: Sunshine Horticultural Services, 2013.

WOLSTENHOLME, B. N. **Avocado rootstocks**: what do we know ; are we doing enough research? 2003. Disponível em: <http://www.avocado.co.za/wp-content/uploads/2015/01/Avocado_Rootstocks.pdf>. Acesso em: 22 jan. 2016.

YOSHIDA, S.; SHIRASU, K. Plants that attack plants: molecular elucidation of plant parasitism. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 15, n. 6, p. 708–13, 2012.

ZENTMYER, G.A. Chemotaxis of zoospores for root exudates. **American Association for the Advancement of Science Stable**, Washington, v. 133, n. 3464, p. 1595–1596, 1961.

ZENTMYER, G. A.; STOREY, W. B. *Phytophthora* canker of macadamia trees. **California Avocado Society Yearbook**, Temecula, v. 45, p. 107–109, 1961.

CAPÍTULO 4 – Estabelecimento *in vitro* de explantes de *Persea americana* de materiais usados como porta-enxerto

RESUMO – O estabelecimento de explantes de espécies frutíferas no processo de propagação *in vitro* é limitado pela alta carga de microrganismos endofitos, sendo assim a seleção e o preparo da planta matriz, chave para o sucesso do processo. Em *Persea americana* Miller a obtenção comercial de porta enxertos é principalmente via semente e alporquia, enquanto que o uso de técnicas *in vitro* ainda é limitado. No presente trabalho, objetivou-se a introdução de explantes de plantas matrizes de 'Duke 7'. Testaram-se três vias de desinfestação: 1- Imersão (10, 15, 20, 30 minutos) de miniestacas, em hipoclorito de sódio (1,5 % m/v); 2- Com gemas apicais, comparando a fonte de cloro (NaOCl ou Ácido tricloro isocianúrico- ATI), tempo de imersão (15 ou 30 mins.), e concentração (50, 100, 150 e 200 mg.L⁻¹); 3- Com miniestacas de brotações estioladas, testando a imersão (10 ou 20 mins) em NaOCl (1% m/v). Os explantes foram dispostos em meio de cultivo SH modificado, e mantidos em sala de crescimento. O delineamento experimental para miniestacas e gemas apicais foi em blocos completos ao acaso, com quatro repetições e a unidade experimental composta de 10 frascos com um explante em cada; foi quantificado o percentual de contaminação. O terceiro experimento foi inteiramente ao acaso com quatro repetições e 10 frascos com um explante em cada sendo a unidade experimental; foi quantificado o percentual de contaminação, discriminado em MFM e MFC e os dados transformados ($\sqrt{X+0,5}$) para alcançar a normalidade. Quando diferentes, as médias foram comparadas pelo método de Scott-knott ($p \leq 0,05$). No primeiro teste com NaOCl (1,5%) não houve diferença entre o tempo de tratamento no percentual de contaminação (40 %). Na desinfestação de gemas apicais, a resposta da fonte de cloro variou em função da concentração e o tempo, sendo o NaOCl mais eficiente na eliminação de MFM e o ATI na eliminação de MFC. Salienta-se que a interação do ATI (200 mg.L⁻¹) por 30 minutos foi a mais eficiente. Finalmente, com miniestacas estioladas, 20 minutos foi mais adequado. Conclui-se que tanto o uso de brotações estioladas, como o uso de ATI para desinfestação, são promissórios no estabelecimento *in vitro* de explantes de abacateiro.

Palavras-chave: abacateiro, ácido tricloro isocianúrico, desinfestação, microrganismos endofíticos

CHAPTER 4 – *In vitro* establishment of *Persea americana* explants used for micropropagation

ABSTRACT – The establishment of axenic explants from fruit plant species for *in-vitro* propagation can be difficult because of the endophytic microorganisms, being the selecting and preparing procedure, a key step to the successfully establishment. In avocado, the commercial technique for obtaining rootstocks is primarily through propagation by seed and layering, and the use of *in vitro* techniques remains limited. The aim of this study was the *in vitro* establishment of avocado 'Duke 7' explants from mature plants. Three methods of disinfection were tested: 1. Immersion (10, 15, 20, and 30 minutes) of minicutting in sodium hypochlorite solution (NaOCl, 1.5% w/v); 2. Using apical buds, compared two sources of chlorine (NaOCl and trichloroisocyanuric acid, TCA), immersion time (15 or 30 min), and concentration (50, 100, 150 and 200 mg. L⁻¹); 3. Minicuttings obtained from etiolated shoots, were soaked (10 or 20 minutes) in NaOCl (1% w/v). The explants were placed in SH modified culture medium and maintained in a growth room. The tests with mini-cuttings and apical buds each was established in a randomized complete block design with four replicates, being, 10 flasks containing one explant, as experimental unit, was set up to quantify the percentage of explants that were contaminated. The test of chlorine sources involved a randomized complete block design in a 2-x-4 factorial with two immersion times and four chlorine concentrations, and the test quantified the percentage of contamination by mycelium forming microorganisms (MFM) or colonies (MFC). The data were transformed ($\sqrt{X + 0.5}$) to achieve normality. The normality of the data was verified by the Crámer-Von-Mises method; treatments were compared by using ANOVAs, and when different, the means were compared by the Scott-Knott method ($p \leq 0.05$). There was no resulting difference between 10 and 30 min of treatment with 1.5% NaOCl on the contamination percentage (40%). For the disinfecting apical buds, the response for each chlorine source varied with concentration and time. NaOCl was more effective for the removal of MFM and TCA than for MFC. Here, using TCA at 200 mg/liter for 30 minutes was the most effective treatment. In the test with etiolated minicuttings, the minimum contamination occurred with 1% NaOCl for 20 minutes. In conclusion, the use of etiolated explants and using TCA acid for disinfection are a promising option for improving the *in-vitro* establishment of avocado explants.

Keywords: avocado, trichloro isocyanuric acid, disinfestation, endophytic microorganisms

4.1 Introdução

Na produção comercial de mudas de abacateiro (*Persea americana* Miller), o uso de porta-enxerto é fator relevante dado a necessidade de adaptação às condições locais de produção, além de conferir maior qualidade às mudas, uma vez que há uma série de benefícios resultantes do uso da enxertia, dentre eles, redução do período de juvenilidade e do porte da planta (HALMA; FROLICH, 1952; CRANE et al., 2013; GOLDSCHMIDT, 2014). Os porta-enxertos podem ser obtidos tanto por via vegetativa como sexuada (através de sementes), sendo que ambas possuem vantagens e desvantagens ou limitações, de acordo com os locais em que serão utilizadas (ERNST; WHILEY; BENDER, 2013).

O uso de semente é associado à alta variabilidade fenotípica, que vai incidir no processo de enxertia, resultando em desuniformidade tanto na exigência dos tratamentos culturais como na produção em condições de campo, o que não é desejável em cultivos comerciais, enquanto que as mudas obtidas por via vegetativa (clonagem) apresentam uniformidade, além de apresentarem, na maioria das vezes, maior volume radicular, porém, múltiplas características dos porta-enxertos, além da referida, devem ser consideradas (DOUHAN, 2009; AYALA SILVA; LEDESMA, 2014).

Para clonagem de mudas para porta-enxerto de abacateiro, a dupla enxertia tem se tornado a alternativa comercial mais empregada, especialmente devido à limitação fisiológica para enraizamento do abacateiro (GOMEZ; SOULE; MALO, 1971; ERNST; WHILEY; BENDER, 2013). Já o uso da propagação *in vitro* viabiliza a capacidade de desdiferenciação e regeneração das células somáticas para o desenvolvimento de novos organismos sob condições axênicas, o que, em termos biológicos, é conhecido como totipotência (VASIL; VASIL, 1972); entretanto, fatores tais como o tipo e preparo do explante, condições da planta matriz, meio de cultivo, influenciam no sucesso da técnica (GEORGE; HALL; KLERK, 2008a).

Quando se realiza a propagação *in vitro*, dentre os explantes mais usados para espécies frutícolas, citam-se: embrião zigótico; gema; ápice; e tecidos somáticos (JAIN; HÄGGMAN, 2007).

Vários estudos têm sido realizados visando a obtenção de mudas por micropropagação em abacateiro (SCHROEDER, 1979, 1980; PLIEGO-ALFARO;

MURASHIGE, 1987; MOHAMED-YASSEEN, 1993; BIASI, 1995; WESSELS, 1996; BARCELO-MUÑOZ et al., 1999; PLIEGO-ALFARO et al., 1999; VIÑA et al., 1999; RAHARJO; LITZ, 2005; AVENIDO et al., 2007; SÁNCHEZ-ROMERO et al., 2007; FUENTES et al., 2013; ENCINA et al., 2014), porém o processo de introdução de explantes viáveis para multiplicação *in vitro* é ainda uma fase limitante, principalmente devido à alta contaminação e oxidação (BUNN; TAN, 2002; GEORGE; HALL; KLERK, 2008b).

Na tentativa de superar esta limitação, estudos utilizando tratamento de explantes são realizados (DALSASO; GUEVARA, 1985; BIASI, 1995), bem como testes de pré-acondicionamento das plantas matrizes para posterior extração do explante (SCHROEDER, 1980; COOPER, 1987; PLIEGO-ALFARO et al., 2013). Para a desinfestação de explantes de espécies frutíferas, referenciam-se produtos tais como cloruro de mercúrio (HgCl_2), dicloro isocianurato de sódio ($\text{C}_3\text{N}_3\text{O}_3\text{Cl}_2\text{Na}$), hipoclorito de sódio (NaOCl), hipoclorito de cálcio ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) e etanol (CH_3CH_2) (GARCÍA et al., 2009; KUMAR; ANAND; REDDY, 2010) em concentrações que variam entre 0,5% e 5% (TEIXEIRA DA SILVA et al., 2003; VARGAS et al., 2004; GATICA; ARRIETA; ESPINOZA, 2007; PAUNESCU, 2009; RODRIGUES; ALMEIDA, 2010) em contato por 15 a 20 minutos.

Dentre os produtos acima citados, o NaOCl (CAS: 87-90-1) apresenta baixo custo e facilidade de manejo quando comparado com os demais (GARCÍA et al., 2009), sendo a fonte de cloro mais utilizada na desinfestação de explantes para propagação *in vitro* (GARCÍA-GONZÁLES et al., 2010). O NaOCl é quimicamente classificado como uma base forte (ESTRELA et al., 2002), com pH em solução comercial acima de 11, enquanto que compostos como o ácido tricloro isocianúrico tem pH ligeiramente ácido.

A biodinâmica do cloro em solução sugere que quanto menor o pH sua ação antimicrobiana aumenta (ESTRELA et al., 2002; TILSTAM; WEINMANN, 2002). Apesar disso, não se conhece do uso de ácido tricloro isocianúrico (CAS: 87-90-1) no preparo de explantes vegetais e há reduzido número de trabalhos referenciando as vantagens do uso em solução do ácido dicloro isocianúrico, outra fonte ácida de menor concentração de cloro, na desinfestação de explantes vegetais (PRENDERGAST; SAYEGH, 1996; NIEDZ; BAUSHER, 2002; MORGENTHAU et al., 2012).

Tanto em relação ao tipo e preparo do explante quanto ao processo de desinfestação em condições de laboratório, uma associação entre a técnica de dupla enxertia proposta adaptada por Hofshi (1996) e o preparo das mudas para produção de explantes proposto por Cooper (1987) poderia ser uma alternativa para clonagem de material adulto.

Assim, objetivou-se com a presente pesquisa a comparação de vias para desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes axênicos a partir de tecido adulto de plantas de 'Duke 7'.

4.2 Material e Métodos

Visando o estabelecimento de explantes axênicos provenientes de plantas adultas de abacateiro de 'Duke 7', foram realizados três testes, tendo como variações principalmente a fonte do explante e o método de desinfestação.

4.2.1 Preparo do meio de cultivo e condições da sala de crescimento

Os testes foram realizados no Laboratório de Micropropagação de Espécies Hortícolas do Departamento de Produção Vegetal, localizado na FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

O meio de cultivo utilizado foi o SH modificado (SCHENK; HILDEBRANDT, 1972) acrescentado de sacarose (25 g L^{-1}), o pH do meio corrigido para 5,7 (± 1) e após, gelificado com ágar (7 g L^{-1}).

Foi utilizado um volume de 25 mL de meio por frasco de vidro de 200 mL e autoclavado por 15 min a 120°C e 1,25 atm., bem como, em alguns casos, o meio foi autoclavado e vertido em câmara de fluxo laminar (quando utilizadas placas de petri).

Para todos os testes realizados, após inoculação os explantes foram incubados no escuro por cinco dias para diminuição da oxidação e posteriormente expostos à luz sob irradiância de $11,4 (\pm 2,66) \mu\text{m.m}^{-2}\text{s}^{-1}$. As condições de desenvolvimento do explante no interior do frasco, medidas utilizando termo higrômetro Instruterm® HT-500, foram: temperatura $22^\circ\text{C} (\pm 0,7)$ e umidade relativa 95,43 % ($\pm 0,7$).

4.2.2 Teste 1 – Tempo de imersão em solução de hipoclorito de sódio na desinfestação de miniestacas

O objetivo deste primeiro teste foi comparar tempos de imersão em hipoclorito de sódio (NaOCl) na desinfestação de miniestacas obtidas de brotações novas crescendo em plantas diretamente no campo.

Foi realizado seguindo o protocolo descrito por Barceló-Muñoz e Pliego-Alfaro (1997), usando brotações novas de uma mesma planta. Os explantes foram lavados com detergente e água corrente, retiradas as folhas e mantidos por 24 horas em solução de tiofanato metílico ($0,7 \text{ g L}^{-1}$) a 25°C . Seguidamente desinfestados em solução de NaOCl (1,5% m/m), segundo o tratamento testado (10, 15, 20 ou 30 minutos) de tempo de imersão em solução acrescentada de polisorbato 20% (1 gota. 100 mL^{-1}). Em câmara de fluxo laminar durante o tratamento, os explantes foram enxaguados três vezes com água deionizada autoclavada (30 minutos a 1,2 ATM) e reduzidos no tamanho aproximado de 1 cm com uma gema lateral em cada (Figura 29).

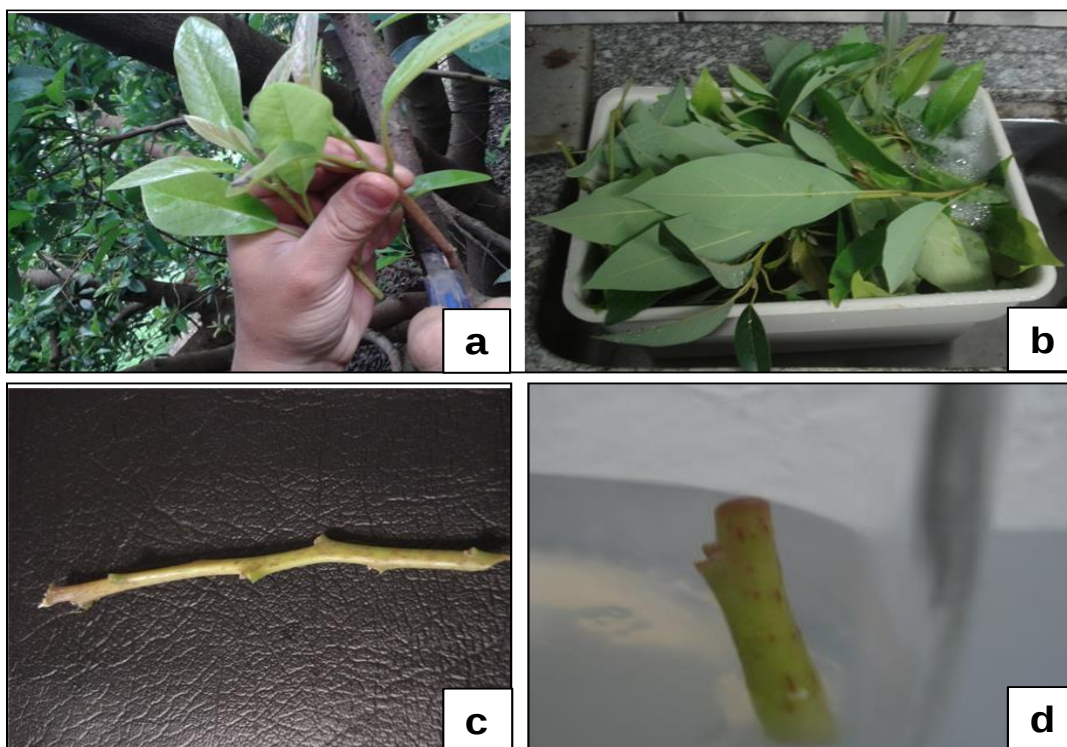


Figura 29. Obtenção de mini estacas de abacateiro ‘Duke 7’ de plantas adultas para estabelecimento *in vitro*. a) Seleção de ramos da planta matriz; b) Pré-lavagem; c) Retirada das folhas; d) Explantes em meio de cultivo SHm.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, sendo a unidade experimental constituída por 10 frascos com um explante em cada, e cada tratamento com quatro repetições. Após 15 dias de estabelecimento foi avaliada a contaminação visível. Foi analisada a normalidade dos dados pelo teste Cramér–von Mises e as médias pelo teste F ($p \leq 0,05$), sendo que, quando houve diferença, estas foram comparadas pelo método de Scott-Knott. ($p \leq 0,05$).

4.2.3 Teste 2 – Comparação de hipoclorito de sódio e ácido tricloro isocianurico na desinfestação de gemas apicais

Neste segundo teste, o objetivo foi comparar duas fontes de cloro na desinfestação de gemas apicais obtidas de brotações em plantas diretamente no campo.

Para isso, brotações não lignificadas, tendo entre cinco e dez centímetros de comprimento, obtidas de plantas adultas de 'Duke 7' foram levadas para condições de laboratório, lavadas com água corrente e detergente, retiradas as folhas e posteriormente seccionadas em frações de aproximadamente dois centímetros. A partir destas porções, gemas apicais em crescimento ativo foram excisadas e dispostas em placas de Petri contendo 25 mL de meio de meio de cultivo SHm (Figura 30).



Figura 30. Explantes juvenis de abacateiro ‘Duke 7’ para o estabelecimento *in vitro* de gemas apicais obtidas de plantas adultas, a. brotação para obtenção da gema, b. gema para estabelecimento *in vitro*, c. Gema excisada e disposta no meio de cultivo SHm.

Foram testadas duas fontes de cloro: NaOCl (produto comercial) e ácido tricloro isocianurico (HCl 200 ®), dois tempos de imersão dos explantes (15 e 30 minutos) e quatro concentrações de cloro (50, 100, 150 e 200 mg. L⁻¹). O pH da solução de tricloro (500 mg. L⁻¹) foi $\pm 3,93$ e o do NaOCl (2,0% m/m) de ± 13 .

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com cinco repetições por tratamento, sendo a unidade experimental composta por cinco placas de petri com 25 mL de meio de cultivo SHm e um explante em cada.

Quinze dias após o estabelecimento dos explantes, foi avaliada a contaminação visível, discriminando a contaminação com microrganismos formadores de micélio (MFM) ou colônia (MFC), e identificados ao nível de gênero os fungos contaminantes que esporularam. Os dados foram transformados ($\sqrt{X+0,5}$) para atingir a normalidade pelo teste Cramér–von Mises, as médias comparadas pelo teste F ($p \leq 0,05$) e quando houve diferença, comparadas pelo método de Scott-Knott. ($P \leq 0,05$).

4.2.4 Teste 3 – Estabelecimento *in vitro* de explantes estiolados de material adulto proveniente de mudas por enxertia

O objetivo deste terceiro teste foi a introdução de explantes de brotações estioladas de tecido adulto, previamente enxertado e desenvolvido sobre mudas de semente mantidas sob casa de vegetação. A produção das mudas e preparo dos enxertos foi realizado em casa de vegetação e sala escura do Departamento de Fitopatologia da FCAV-UNESP.

Para obtenção das mudas, foram selecionadas sementes obtidas de frutos maduros e sadios da variedade 'Hass'. As sementes foram extraídas, desinfestadas com NaOCl (2%) por 20 minutos e enxaguadas antes de serem semeadas em saco plástico transparente de 300 mL contendo mistura autoclavada de solo e areia (1:1 v/v) como substrato. As mudas foram classificadas e aquelas que atingiram diâmetro mínimo de 0,5 cm foram transplantadas em vasos de 2 L para serem usadas como porta-enxerto.

Foram enxertados explantes dos materiais 'Duke 7' e 'Toro canyon'. A irrigação das plântulas foi feita manual e individualmente para evitar molhar a parte aérea da planta. Quando desenvolvidos os enxertos, das primeiras brotações foi retirada a região do ápice visando romper a dominância apical e induzir maior número de brotações e com menor vigor (Figura 31). Neste ponto, como pré-tratamento, as mudas foram levadas dispostas em uma sala na ausência de luz (Apêndice 1) para induzir o estiolamento das brotações, sendo nelas aplicada quatro vezes, com intervalo semanal, solução de tiofanato metílico ($0,7 \text{ g.L}^{-1}$) mais Pentabiol® (500 mg.L^{-1}) para redução da microbiota endofítica.

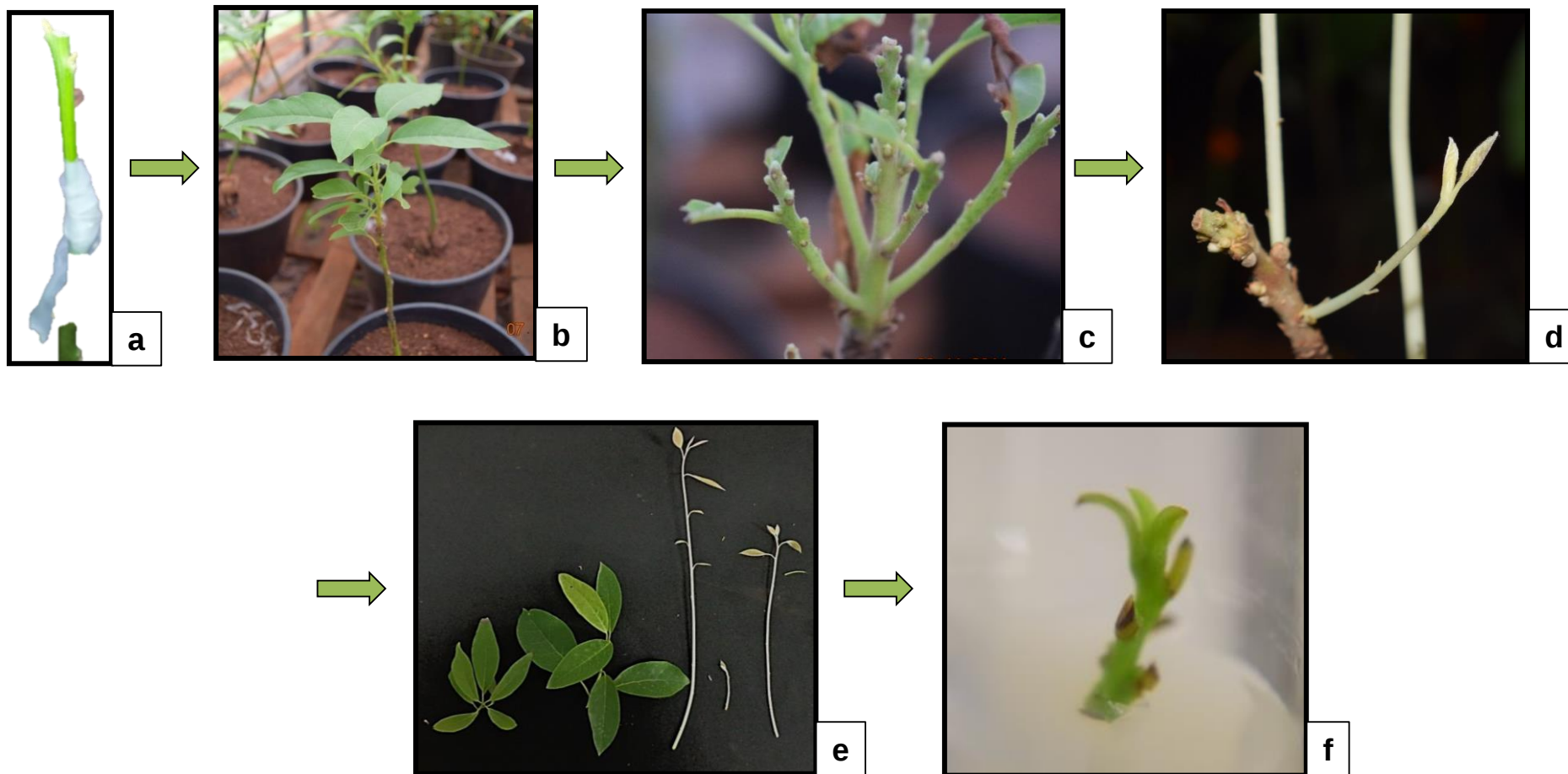


Figura 31. Sequência para obtenção de explantes estiolados de abacateiro para estabelecimento *in vitro* a partir de plantas enxertadas. A) Enxertia em fenda cheia; b) Desenvolvimento das gemas do enxerto; c) Multibrotação induzida pela quebra da dominância apical; d) Brotações incubadas no escuro; e) Comparação de brotações normais (esquerda) e estioladas (direita); e f) Miniestaca axênica em meio de cultivo.

Após cinco semanas os explantes foram excisados, deixando pelo menos uma gema na matriz, e levados para o laboratório de micropropagação. Para desinfestação, os explantes foram lavados com detergente e água corrente, seccionados em porções de ± 1 cm com uma gema, mergulhados por um minuto em etanol (70%). Já em câmara de fluxo laminar, testou-se a imersão (10 ou 20 minutos) em NaOCl (1%) e avaliada a contaminação visível, discriminando entre contaminante formador de micélio e de colônia, quinze dias após estabelecimento.

Finalmente enxaguados quatro vezes com água deionizada autoclavada (1,2 ATM por 30 minutos) antes de serem colocados no meio de cultivo.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo a unidade experimental composta de 10 explantes com quatro repetições. Os dados foram transformados ($\sqrt{X+0,5}$) para atingir a normalidade pelo teste Cramér-von Mises, as médias comparadas pelo teste F ($p \leq 0,05$) e quando houve diferença, comparadas pelo método de Scott-Knott. ($p \leq 0,05$).

4.3 Resultados e Discussão

A cinética dos produtos como o cloro, usado durante o processo de desinfestação de explantes vegetais para estabelecimento *in vitro* é um assunto pouco estudado, sendo que a eficácia na eliminação dos microrganismos, potencialmente contaminantes, é dependente de fatores como o tipo de explante, tempo de contato, pH da solução, entre outros (HAAS, 1980; WENHUI; MENG, 2013).

Assim, para o estabelecimento dos explantes no meio de cultivo, provenientes de tecido adulto, apresentam-se os resultados dos três testes.

4.3.1 Teste 1 – Tempo de imersão em solução de hipoclorito de sódio na desinfestação de miniestacas

Na concentração de NaOCl utilizada para desinfestação das miniestacas não houve diferença entre o tempo de imersão sobre o percentual de explantes axênicos ($p = 0,132$), sendo entre eles em média de 40% (C.V: 13,5 %) observando-se que o estabelecimento *in vitro* foi altamente limitado pelo crescimento de microrganismos,

em níveis que inviabilizariam o protocolo para o abacateiro.

Apesar de terem sido utilizadas concentrações biocompatíveis (ESTRELA et al., 2002), a baixa taxa de desinfestação pode ter sido favorecida pela alta carga de microrganismos endófitos, típico de tecido vegetal sob condições naturais (CASSELLS; O'HERLIHY, 2003; JAIN; HÄGGMAN, 2007).

Por sua vez, na introdução de explantes de abacateiro, Zulfiqar et al. (2009) relataram que o aumento da concentração de cloro, mesmo sendo ainda considerada alta; (0,5 - 2,0%) em contato por 10 minutos favoreceu a diminuição da contaminação. Outros autores relatam que usando solução de NaOCl (0,5% m/m) por 10 minutos, o sucesso da desinfestação é associado com o uso de brotações novas, oriundas de podas realizadas no material adulto (BARCELÓ-MUÑOZ; PLIEGO-ALFARO, 1997; PLIEGO-ALFARO et al., 1999).

Alguns autores referem à contaminação como uma limitante constante quando se trabalha com este tipo de espécies e deve ser abordada em diferentes aspectos, isto é, na seleção do explante e planta matriz, no manejo e preparo da planta e na desinfestação e tratamento do explante no laboratório (CASSELLS; O'HERLIHY, 2003; JAIN; HÄGGMAN, 2007).

4.3.2 Teste 2 – Desinfestação de gemas apicais comparando hipoclorito de sódio e ácido tricloro isocianúrico

A análise separada das fontes de cloro: hipoclorito de sódio (NaOCl) e ácido tricloro isocianúrico (ATI), bem como a concentração, sobre a incidência de MFM e MFC sugerem respostas distintas em função das propriedades das referidas.

Quando utilizado ATI, não houve interação entre o tempo de tratamento e a concentração na incidência de MFC, enquanto que na incidência de MFM a interação entre o tempo e a concentração foi significativa (Tabela 13).

Tabela 13. Resumo da análise de variância para efeitos principais e interação quando utilizado ácido tricloro isocianúrico na contaminação com microrganismos formadores de micélio (MFM) ou colônia (MFC) para estabelecimento *in vitro* de explantes de abacateiro.

Variável	MFM	MFC	MFM e MFC
M.I (A)			
15	81,0 a	0,0 ns	17,0 ns
30	64,0 b	0,0	10,0
Conc. (B)			
50	100 a	0,0 ns	0,0 b
100	76,0 b	0,0	16,0 a
150	70,0 b	0,0	20,0 a
200	44,0 c	0,0	18,0 a
C.V (%)	6,33	0,001	9,33
P (A)	0,0005	1,000	0,081
P (B)	< 0,0001	1,000	0,003
P (AxB)	< 0,0001	1,000	0,210

Letras em cada coluna mostram diferença significativa pelo teste Scott-knott ($p \leq 0,05$) quando significativo ao nível de significância de 5% pelo teste F. NS = não significativo; M.I: minutos de imersão; Conc.: concentração (mg.L^{-1}).

A partir da análise do desdobramento da interação usando ATI, infere-se que, tanto em 15 como 30 minutos de exposição dos explantes na solução, o aumento da concentração de cloro foi inversamente proporcional à contaminação. Porém, quando comparado dentro de cada concentração, apenas com 200 mg.L^{-1} por 30 minutos, ocorre a maior redução significativa da contaminação (Tabela 14).

Tabela 14. Desdobramento da interação entre o tempo de imersão (A) e a concentração do ácido tricloro isocianúrico - ATI (B) sobre o percentual de explantes contaminados por microrganismos formadores de micélio para estabelecimento *in vitro* de explantes de abacateiro.

Concentração do ATI	Tempo (min.)		P ($\leq 0,05$)
	15	30	
50	100 Aa	100 Aa	1,000
100	84 Aa	68 Ba	0,112
150	68 Ba	72 Ba	0,685
200	72 Ba	16 Cb	< 0,0001
P ($\leq 0,05$)	0,019	< 0,0001	

Letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas entre as linhas mostram diferença significativa pelo teste Scott-knott ($p \leq 0,05$) quando significativo ao nível de significância de 5% pelo teste F. NS = não significativo.

Já em relação ao NaOCl não houve interação entre os fatores analisados. Na discriminação do tipo de contaminação, há relativamente alta eliminação de MFM, independente do tempo de tratamento e concentração da solução (Tabela 15), similar à resposta da incidência conjunta de MFM e MFC. Adicionalmente, encontrou-se que na maior concentração houve também maior incidência de MFC, o que sugere maior eficácia deste na eliminação de microrganismos filamentosos, que segundo os resultados, em todos os tratamentos a incidência foi relativamente baixa.

Tabela 15. Resumo da análise de variância para efeitos principais e interação, no percentual de explantes contaminados com microrganismos formadores de micélio (MFM) ou colônia (MFC) quando utilizado hipoclorito de sódio na desinfestação para estabelecimento *in vitro* de explantes de abacateiro.

Variável	MFM	MFC	MFM e MFC
M.I. (A)			
15	10,0 ns	47,0 b	27,0 a
30	8,0	67,0 a	13,0 b
Conc. (B)			
50	12,0 ns	44,0 b	22,0 b
100	10	52,0 b	18,0 b
150	6,0	56,0 b	38,0 a
200	8,0	76,0 a	2,0 c
C.V (%)	11,35	8,22	10,45
P (A)	0,640	0,001	0,0069
P (B)	0,805	0,003	0,0001
P (AxB)	0,286	0,530	0,0051

Letras em cada coluna mostram diferença significativa pelo teste Scott-knott ($p \leq 0,05$) quando significativo ao nível de significância de 5% pelo teste F, ns = não significativo; M.I.: minutos de imersão; Conc.: concentração (mg.L^{-1}).

Ao analisar a incidência dos tratamentos sobre o percentual de explantes axênicos, houve interações tanto do produto com o tempo, como do produto com a concentração (Tabela 16) cuja análise de desdobramento encontra-se seguidamente.

Tabela 16. Resumo da análise de variância para efeitos principais e interação dos produtos químico (A), tempo de tratamento (B) e concentração do produto (C) na desinfestação de explantes para estabelecimento *in vitro* de abacateiro.

Variável	Explantes axênicos (%)
Produto (A)	
Ácido tricloro isocianurico	14,0 ns
Hipoclorito de sódio	14,0
Conc. M.I (B)	
15	9,0 b
30	19,0 a
mg. L⁻¹	
50	11,0 b
100	14,0 b
150	5,0 b
200	26 a
C.V (%)	9,40
P (A)	0,644
P (B)	0,0017
P (C)	0,0001
Interação AxB	≤ 0,0001
Interação AxC	≤ 0,0001
Interação BxC	0,115

Letras na coluna mostram diferença significativa pelo teste Scott-knott ($p \leq 0,05$) quando significativo ao nível de significância de 5% pelo teste F, ns = não significativo; M.I: minutos de imersão; Conc.: concentração (mg.L⁻¹).

No desdobramento da interação entre o produto utilizado na desinfestação e o tempo de tratamento, observa-se que a eficácia da concentração de cloro pode ser afetada pelo tempo de contato com o explante, tal como referido em outros trabalhos (PARKINSON; PRENDERGAST; SAYEGH, 1996; ESTRELA et al., 2002), sendo que com 15 minutos o ATI atingiu a maior taxa de desinfestação dentre todas as interações, enquanto que o NaOCl não apresentou diferença significativa para os diferentes tempos de tratamento (Tabela 17). A maior eficiência da desinfestação com maior tempo de tratamento, quando usadas soluções acidificadas de cloro

referenciadas previamente (NIEDZ; BAUSHER, 2002), pode ser causada pela liberação mais lenta de HOCl do ATI, enquanto que o NaOCl já se encontra em solução (HAAS, 1980; CASSELLS, 2012; DROGUI; DAGHRIR, 2015).

Tabela 17. Desdobramento da interação entre o produto utilizado no tratamento (A) e o tempo de imersão (B) sobre o percentual de explantes de abacateiro axênicos para estabelecimento *in vitro*.

Produto	Minutos de imersão		P ($\leq 0,05$)
	15	30	
Ácido tricloro isocianúrico	2,0 Bb	26,0 Aa	$\leq 0,0001$
Hipoclorito de sódio	16,0 Aa	12,0 Ba	0,313
P ($\leq 0,05$)	0,0005	0,0038	

Letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas entre as linhas mostram diferença significativa pelo teste Scott-knott ($p \leq 0,05$) quando significativo ao nível de significância de 5% pelo teste F. NS = não significativo.

A análise da interação entre produto e concentração permite inferir que o aumento da concentração utilizada afeta negativamente a resposta do NaOCl e, no caso do ATI a eficiência aumentou com a concentração, a pesar de baseado no observado na Tabela 18. Possivelmente as concentrações testadas foram inferiores às adequadas para eliminação de microrganismos, pois segundo Parkinson, Prendergast, Sayegh (1996), no tratamento por 30 minutos (5000 mg.L^{-1}) obteve-se o nível adequado de desinfestação, e ainda no controle de biofilmes de *Pseudomonas* sp e células de plâncton, Morgenthau et al. (2012) encontraram adequadas concentrações a partir de 300 mg.L^{-1} .

Tabela 18. Desdobramento da interação entre os produtos, ácido tricloro isocianurico (ATI) e Hipoclorito de sódio (NaOCl) (A) e a concentração (C) sobre o percentual de explantes de abacateiro axênicos para estabelecimento *in vitro*.

Concentração (mg.L)	Produto		P ($\leq 0,05$)
	ATI	NaOCl	
50	0,0 Bb	22,0 Aa	0,000
100	8,0 Bb	20,0 Aa	0,023
150	10,0 Ba	0,0 Ba	0,072
200	38,0 Aa	14,0 Ab	0,001
P ($\leq 0,05$)	$< 0,0001$	0,0005	

Letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas entre as linhas mostram diferença significativa pelo teste Scott-knott ($p \leq 0,05$) quando significativo ao nível de significância de 5% pelo teste F. NS = não significativo.

Nas referências científicas, poucos estudos comparam as propriedades químicas dos compostos clorados com a eficiência na desinfestação (WANG; CHENG; QIAO, 2004; WENHUI; MENG, 2013). No entanto, na área da saúde humana, estudos sugerem que há aumento do efeito quando utilizada solução ligeiramente acidificada (pH 6,5) de NaOCl (4,2 %) do que com pH básico (MERCADÉ et al., 2009), ao mesmo tempo em que se incrementa sua citotoxidez (AUBUT et al., 2010).

No caso do ATI, o maior percentual de desinfestação, obtido com 30 minutos de contato na maior concentração testada, pode estar associado ao aumento da cinética do cloro em solução de pH ácido, segundo Drogui e Daghrir (2015), regulado pelo ácido hipocloroso (HOCl), responsável em grande medida pelo efeito biocida, favorecido pelo pH baixo do ATI, enquanto que pH alto, como o do NaOCl, pode causar sua dissociação e diminuir seu poder degradante (HELING et al., 2001; CLASEN; EDMONDSON, 2006).

Já em relação ao NaOCl, contrário ao anterior, a eliminação de MFM não foi afetada pelo aumento do tempo e concentração, mas sim inibida a eliminação de MFC. A inibição com o aumento da concentração pode estar relacionada com o aumento da repulsão eletrostática dada pelo HOCl em solução (ESTRELA et al., 2002; DROGUI; DAGHRIR, 2015). O fato de o NaOCl ser menos eficiente na eliminação de MFC que de MFM pode estar relacionado com a disposição deles no tecido e outras características próprias deste tipo de organismos (BUNN; TAN, 2002) ou por sua habilidade para crescer neste tipo de meio de cultivo (VISS; BROOKS; DRIVER, 1991).

A maior redução dos MFC incide diretamente no aprimoramento do protocolo, pois microrganismos como as leveduras ou bactérias são frequentes no estabelecimento *in vitro* de explantes vegetais e considerados de mais sério tratamento pela capacidade de crescimento rápido em meio rico de sacarose, modificação do meio circundante e via fermentação produzir álcool e ácido acético (CASSELLS, 2012; MBAH; WAKIL, 2012).

Embora os índices de desinfestação obtidos no teste são ainda abaixo do ideal para processos de micropropagação, de acordo com Bunn e Tan (2002), por se tratar de material de campo são percentuais considerados normais.

Finalmente, é necessário continuar testando soluções acidificadas de cloro para aprimorar o seu uso em explantes vegetais.

4.3.3 Teste 3 – Estabelecimento *in vitro* de explantes estiolados de material adulto proveniente de mudas por enxertia

Após o processo para o preparo do explante, somente sobreviveram enxertos do material 'Duke 7', razão pela qual somente são apresentados dados do referido. Do 'Toro canyon' durante o processo de desenvolvimento dos enxertos, houve quedas das folhas, posterior necrose gradativa das gemas e finalmente do enxerto (Figura 32).



Figura 32. Sintomas de necrose em enxertos de abacateiro 'Toro canyon' em condições de casa de vegetação associados com estresse por alta temperatura; a. Necrose apical; b. Queima inicial das folhas; c. Sintoma das folhas após abscisão.

O menor percentual de contaminação entre os três testes apresentados neste capítulo, de 23%, foi conseguido neste terceiro, quando utilizados explantes de brotações dos enxertos desenvolvidos segundo o descrito na metodologia.

Em relação ao tempo de exposição ao tratamento na solução de NaOCl, quando os explantes foram tratados por 20 minutos houve menor incidência de MFC que na exposição de 10 minutos ($p=0,016$). Por sua vez, a do MFM foi baixa nos dois tratamentos e não diferiu entre eles ($p=0,507$), tal como observado na Figura 33.

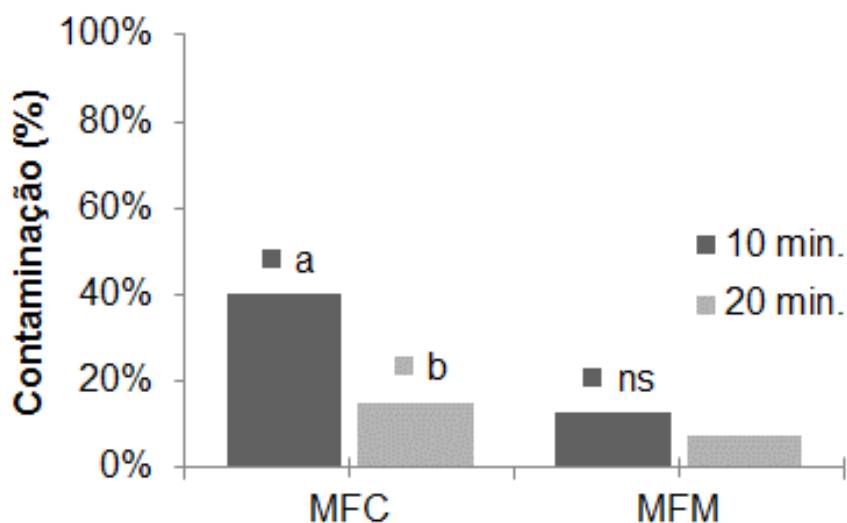


Figura 33. Percentual de contaminação por microrganismos formadores de micélio (MFM) e formadores de colônias (MFC) obtidos de brotações estioladas, quando tratados com hipoclorito de sódio (1% m/m) por 10 e 20 minutos, para o estabelecimento *in vitro* de explantes de abacateiro.

Similar ao referenciado em trabalhos precedentes, o preparo do material das plantas matrizes tal como realizado neste teste com a aplicação de fungicida e antibiótico, constitui um passo fundamental para a viabilização do estabelecimento *in vitro* (BUNN; TAN, 2002).

Finalmente, o rejuvenescimento do material adulto induzido através da enxertia e estiolamento, possibilita também incrementar a eficiência na desinfestação com tratamento menos agressivo e mais rápido, o que repercute na diminuição da oxidação e consecutiva morte dos tecidos (COOPER, 1987; GEORGE; HALL; KLERK, 2008b; BUNN; TURNER; DIXON, 2011).

A maior taxa de estabelecimento de explantes obtidos de brotações estioladas, está relacionada, segundo Bunn e Tan (2002), com o crescimento acelerado do tecido e redução dos compostos fenólicos que atuam em detrimento do explante *in vitro*.

4.4 Conclusões

Comparando o produto e o tempo de imersão, o maior tempo de exposição do tecido aumenta a eficiência do Ácido tricloro isocianúrico, entanto que com 15 minutos o hipoclorito de sódio foi mais eficiente.

Em ambos os produtos, Ácido tricloro isocianúrico e hipoclorito de sódio, a concentração de 200 mg.L⁻¹ foi a mais eficiente, no entanto, nessa concentração com o ATI o percentual foi maior.

Entre as metodologias testadas para o estabelecimento *in vitro* de explantes de plantas adultas de abacateiro, a produção de explantes em ambiente protegido via enxertia constitui a mais viável e eficiente.

4.5 Referências

AUBUT, V.; POMMEL, L.; VERHILLE, B.; ORSIÈRE, T.; GARCIA, S.; ABOUT, I.; CAMPS, J. Biological properties of a neutralized 2.5% sodium hypochlorite solution. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, Amsterdam, v. 109, n. 2, p. 120–125, 2010.

AVENIDO, R. A.; PATENA, L. F.; DIMACULANGAN, J. G.; WELGAS, J. N.; BARBA, R. C. Complete micropropagation system of avocado, from somatic embryogenesis to successful transplant to soil, and its application to mutation breeding. In: Scientific Conference, Development Academy of the Philippines. **Anais...** 2007. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=PH2008001422>>. Acesso em: 18 jun. 2015.

AYALA SILVA, T.; LEDESMA, N. Avocado History, Biodiversity and Production. In: NANDWANI, D. (Ed.). **Sustainable horticultural systems: issues, technology and innovation**. Sustainable Development and Biodiversity. Heidelberg: Springer International Publishing, 2014. v. 2, p. 157–205.

BARCELO-MUÑOZ, A.; ENCINA, C. L.; SIMÓN-PÉREZ, E.; PLIEGO-ALFARO, F. Micropropagation of adult avocado. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 58, n. 1, p. 11–17, 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1023/A:1006305716426>>.

BARCELO-MUÑOZ, A. Y.; PLIEGO-ALFARO, F. **Método para la micropropagación de aguacate (*Persea americana* Mill.) adulto**. Madrid: Oficina Española de Patentes y Marcas, 1997. (P9700700).

BIASI, L. A. Fitotoxicidade de três antibióticos na cultura *in vitro* de abacateiro. **Bragantia**, Campinas, v. 54, n. 2, p. 251–256, 1995. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87051995000200003>>.

BUNN, E. ; TAN, B. Microbial contaminants in plant tissue culture propagation. In: SIVASITHAMPARAMA, K.; DIXON, K. W.; BARRETT, R. L. (Eds.). **Microorganisms in plant conservation and biodiversity**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002. p. 307–335.

BUNN, E.; TURNER, S. R.; DIXON, K. W. Biotechnology for saving rare and threatened flora in a biodiversity hotspot. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Heidelberg, v. 47, n. 1, p. 188–200, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11627-011-9340-0>>.

CASSELLS, A. C.; O'HERLIHY, E. A. Micropropagation of woody trees and fruits: pathogen elimination and contamination management. In: JAI, S. M.; ISHII, K. (Eds.). **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 103–128.

CASSELLS, A. C. Pathogen and biological contamination management in plant tissue culture: phytopathogens, vitro pathogens, and vitro pests. In: LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. (Eds.). **Plant cell culture protocols**. Totowa: Humana Press, 2012. p. 57–80.

CLASEN, T.; EDMONDSON, P. Sodium dichloroisocyanurate (NaDCC) tablets as an alternative to sodium hypochlorite for the routine treatment of drinking water at the household level. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Muenchen, v. 209, n. 2, p. 173–181, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2005.11.004>>.

COOPER, P.A. Advances in the micropropagation of avocado (*Persea americana* Mill.). **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 212, p. 571–576, 1987. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.1987.212.92>>.

CRANE, J. H.; DOUHAN, G.; FABER, B. A.; ARPAIA, M. L.; BENDER, G. S.; BALERDI, C. F.; BARRIENTOS-PRIEGO, A. F. Cultivars and rootstocks. In: SCHAFFER, B., WOLSTENHOLME, B. N., WHILEY, A. W. (Eds.). **The avocado: botany, production and uses**. Wallingford: CABI, 2013. p. 200–233. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1079/9781845937010.0000>>.

DALSASO, L.; GUEVARA, E. Multiplicación clonal *in vitro* del aguacate (*Persea americana*) cv. 'Fuerte'. **Agronomía Costarricense**, San Jose, v. 13, n. 1, p. 61–71, 1985.

DOUHAN, G. W. Current and future perspectives regarding avocado rootstock breeding at UCR. **California Avocado Society – Yearbook**, Temecula, v. 92, p. 87–111, 2009.

DROGUI, P.; DAGHRIR, R. Chlorine for water disinfection: properties, applications and health effects. In: LICHTFOUSE, E.; SCHWARZBAUER, J.; ROBERT, D. (Eds.). **CO₂ sequestration, biofuels and depollution**. Québec: Springer International Publishing, 2015. p. 1–32.

ENCINA, C. L.; PARISI, A.; O'BRIEN, C.; MITTER, N. Enhancing somatic embryogenesis in avocado (*Persea americana* Mill.) using a two-step culture system and including glutamine in the culture medium. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 165, p. 44–50, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2013.10.019>>.

ERNST, A. A.; WHILEY, A. W.; BENDER, G. S. Propagation. In: SCHAFFER, B.; WOLSTENHOLME, B. N.; WHILEY, A. W. (Eds.). **The avocado: botany, production and uses**. 3. ed. Wallingford: CABI, 2013. p. 234–267.

ESTRELA, C.; ESTRELA, C. R. A.; BARBIN, E. L.; SAPANÓ, J. C. E.; MARCHESAN, M. A.; PÉCORA, J. D. Mechanism of action of sodium hypochlorite. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v. 13, n. 2, p. 113–117, 2002.

FERNANDEZ NOGUEIRA, C.; ROOYEN, Z. V.; KÖHNE, S. Reasons for the use of clonal avocado rootstocks around the world. In: WORLD AVOCADO CONGRESS, 7., 2011, Cairns, Australia. **Anais...** Cairns: Avocados Australia, 2011. CD-ROM.

FUENTES, J. L.; RODRÍGUEZ, N. N.; SANTIAGO, L.; VALDÉS, Y.; RAMÍREZ, I. M.; RODRÍGUEZ, J. A. Zygotic embryo culture in avocado (*Persea americana* Mill.). **Cultivos Tropicales**, San Jose de las Lajas, v. 25, n. 3, p. 73–76, 2013.

GARCÍA, M. B.; ABEAL, E. E.; RODRÍGUEZ, I. P.; RODRÍGUEZ, S. M. Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. **Revista Colombiana de Biotecnología**, Bogotá, v. 11, n. 2, p. 127–135, 2009.

GARCÍA-GONZÁLES, R.; QUIROZ, K.; CARRASCO, B.; CALIGARI, P. D. S. Plant tissue culture: current status, opportunities and challenges. **Ciencia e Investigación Agraria**, Santiago, v. 37, n. 3, p. 5–30, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-16202010000300001>>.

GATICA-ARIAS, A. M.; ARRIETA, G.; ESPINOZA, A. M. Comparison of three *in vitro* protocols for direct somatic embryogenesis and plant regeneration of *Coffea arabica* L. cvs. Caturra and Catuaí. **Agronomía Costarricense**, San Jose, v. 31, n. 1, p. 86–94, 2007.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. Plant tissue culture procedure – background. In: _____ (Ed.). **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 2008a. p. 1–28.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. Stock plant physiological factors affecting growth and morphogenesis. In: _____ (Eds.). **Plant propagation by tissue culture**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2008b. p. 403–422.

GOLDSCHMIDT, E. E. Plant grafting: new mechanisms, evolutionary implications. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, p. 1–9, 2014.

GOMEZ, R. E.; SOULE, J.; MALO, S. E. Avocado air layers--a study of seven varieties during a year's cycle. **American Society for Horticultural Science**, Geneva, v. 5, p. 113–120, 1971.

HAAS, C. N. A mechanistic kinetic model for chlorine disinfection. **Environmental Science & Technology**, Dordrecht, v. 14, n. 3, p. 339–340, 1980. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/es60163a012>>.

HALMA, F.; FROLICH, E. An approach to the evaluation of avocado rootstock variability. **California Avocado Society. Yearbook**, Temecula, v. 37, p. 154–158, 1952.

HELING, I.; ROTSTEIN, I.; DINUR, T.; SZWEC-LEVINE, Y.; STEINBERG, D. Bactericidal and cytotoxic effects of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate solutions *in vitro*. **Journal of Endodontics**, Philadelphia, v. 27, n. 4, p. 278–280, 2001.

HOFSHI, R. Experiments with cloning avocado rootstocks. **California Avocado Society – Yearbook**, Temecula, v. 80, p.103–108, 1996.

JAIN, S. M.; HÄGGMAN, H. **Protocols for micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. 559 p.

KUMAR, N.; ANAND, K. G. V.; REDDY, M. P. Shoot regeneration from cotyledonary leaf explants of *Jatropha curcas*: a biodiesel plant. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 32, n. 5, p. 917–924, 2010.

MBAH, E. I.; WAKIL, S. M. Elimination of bacteria from *in vitro* yam tissue cultures using antibiotics. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 94, n. 1, p. 53–58, 2012.

MERCADE, M.; DURAN-SINDREU, F.; KUTTLER, S.; ROIG, M.; DURANY, N. Antimicrobial efficacy of 4.2% sodium hypochlorite adjusted to pH 12, 7.5, and 6.5 in infected human root canals. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, Amsterdam, v.107, n.2, p.295–298, 2009.

MOHAMED-YASSEEN, Y. Morphogenesis of Avocado *in vitro*. A Review. **California Avocado Society – Yearbook**, Temecula, v. 77, p. 101–105, 1993.

MORGENTHAU, A.; NICOLAE, A. M.; LAURSEN, A. E.; FOUCHER, D. A.; WOLFAARDT, G. M. Hausner M. Assessment of the working range and effect of sodium dichloroisocyanurate on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and planktonic cells. **Biofouling**, Oxfordshire, v. 28, n. 1, p. 111–120, 2012.

NIEDZ, R. P.; BAUSHER, M. G. Control of *in vitro* contamination of explants from greenhouse-and field-grown trees. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Heidelberg, v. 38, n. 5, p. 468–471, 2002.

PARKINSON, M.; PRENDERGAST, M.; SAYEGH, A. J. Sterilisation of explants and cultures with sodium dichloroisocyanurate. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 20, n. 1, p. 61–66, 1996.

PAUNESCU, A. Biotechnology for endangered plant conservation: a critical overview. **Romanian Biotechnological Letters**, Bucharest, v. 14, n. 1, p. 4095–4103, 2009.

PLIEGO-ALFARO, F.; BARCELÓ-MUÑOZ, A.; SIMÓN-PÉREZ, E.; VIÑA-NIETO, G.; SÁNCHEZ-ROMERO, C.; PERÁN-QUESADA, R. La micropropagación en la mejora de patrones de aguacate (*Persea americana* Mill): problemas y limitaciones. **Revista Chapingo**, Chapingo, v. 5, p. 239–244, 1999.

PLIEGO-ALFARO, F.; BARCELÓ-MUÑOZ, A.; LÓPEZ-GÓMEZ, R.; IBARRA-LACLETTE, L.; HERRERA-ESTRELLA, L.; PALOMO-RÍOS, E.; MERCADO, J. A.; LITZ, R. E. Biotechnology. In: SCHAFFER, B.; WOLSTENHOLME, B. N.; WHILEY, A.W. (Eds.). **The avocado: botany, production and uses**. Wallingford: CABI, 2013. p. 268–300.

PLIEGO-ALFARO, F.; MURASHIGE, T. Possible rejuvenation of adult avocado by graftage onto juvenile rootstocks *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v. 22, n. 6, p. 1321–1324, 1987.

RAHARJO, S. H. T.; LITZ, R. E. Micrografting and ex vitro grafting for somatic embryo rescue and plant recovery in avocado (*Persea americana*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 82, n. 1, p. 1–9, 2005.

RODRIGUES, F. R.; ALMEIDA, W. A. B. Calogênese em *Cissus sicyoides* L. a partir de segmentos foliares visando à produção de metabólitos *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n. 3, p. 333–340, 2010.

SÁNCHEZ-ROMERO, C.; PERÁN-QUESADA, R.; MÁRQUEZ-MARTÍN, B.; BARCELÓ-MUÑOZA, A.; PLIEGO-ALFARO, F. *In vitro* rescue of immature avocado (*Persea americana* Mill.) embryos. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 111, n. 4, p. 365–370, 2007.

SCHENK, R. U.; HILDEBRANDT, A. C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 50, n. 1, p. 199–204, 1972.

SCHROEDER, C. A. Etiolation and avocado bud elongation *in vitro*. **California Avocado Society – Yearbook**, Temecula, v. 63, p. 86–89, 1979.

SCHROEDER, C. A. Avocado tissue *in vitro*. **California Avocado Society – Yearbook**, Temecula, v. 64, p. 139–142, 1980.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; NHUT, D. T.; TANAKA, M.; FUKAI, S. The effect of antibiotics on the *in vitro* growth response of chrysanthemum and tobacco stem transverse thin cell layers (tTCLs). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 97, n. 3–4, p. 397–410, 2003. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4238\(02\)00219-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4238(02)00219-4)>.

TILSTAM, U.; WEINMANN, H. Trichloroisocyanuric Acid: a safe and efficient oxidant. **Organic Process Research & Development**, Washington, v. 6, n. 4, p. 384–393, 2002.

VARGAS, T. E.; MEJÍAS, A.; OROPEZA, M.; GARCÍA, E. Plant regeneration of *Anthurium andreanum* cv Rubrun. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v. 7, n. 3, p. 10–11, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2225/vol7-issue3-fulltext-11>>.

VASIL, I. K.; VASIL, V. Totipotency and embryogenesis in plant cell and tissue cultures. **In Vitro**, Heidelberg, v. 8, n. 3, p. 117–125, 1972.

VIÑA, G. D. L.; PLIEGO-ALFARO, F.; DRISCOLL, S. P.; MITCHELL, V. J.; PARRY, M. A.; David W.; LAWLOR, D. W. Effects of CO₂ and sugars on photosynthesis and composition of avocado leaves grown *in vitro*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Issy les Moulineaux, v. 37, n. 7–8, p. 587–595, 1999. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)80111-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0981-9428(00)80111-4)>.

VISS, P. R.; BROOKS, E. M.; DRIVER, J. A. A simplified method for the control of bacterial contamination in woody plant tissue culture. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Heidelberg, v. 27, n. 1, p. 42–42, 1991.

WANG, Y.; CHENG, Y.; QIAO, M. Study on properties of DA chlorine-containing disinfectant. **Chinese Journal of Disinfection**, Beijing, v. 1, p. 5–7, 2004.

WENHUI, Z.; MENG, Z. The performance of Trichloro-isocyanuric acid effervescent disinfectant tablets. **Journal of Environmental Hygiene**, Beijing, v. 5, p. 24, 2013.

WESSELS, H. *In vitro* Clonal Propagation of Avocado Rootstocks. **South African Avocado Growers' Association Yearbook**, Limpopo, v. 19, p. 59–60, 1996.

ZULFIQAR, B.; ABBASI, N. A.; AHMAD, T.; HAFIZ, I. A. Effect of explant sources and different concentrations of plant growth regulators on *in vitro* shoot proliferation and rooting of avocado (*Persea americana* Mill.) cv. “Fuerte”. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v.41, n.5, p.2333–2346, 2009.

CAPÍTULO 5 – Armazenamento de embriões no desenvolvimento *in vitro* de eixos embrionários de *Persea americana* Mill

RESUMO – A produção de porta-enxertos de *Persea americana* envolve aspectos como inocuidade, desenvolvimento, adaptação dos materiais às condições do meio ambiente, e outros que divergem entre o uso de clonagem ou semente. O uso de técnicas acuradas de micropropagação permite a obtenção de mudas saudáveis, ao mesmo tempo em que fixa características genéticas. Em abacateiro, o estabelecimento *in vitro* de explantes de plantas adultas constitui a principal limitação, entando que para as fases posteriores, referencia-se o uso de MS, SH e WPM. Neste estudo, comparou-se a biometria de embriões de ‘Toro canyon’ e ‘Duke 7’. Sob condições *in vitro*, o desenvolvimento dos eixos, nos meios MS, MS 30% e SHm, sem e após dois meses de armazenamento (10 °C) em saco plástico, com ou sem perfurações. Adicionalmente o desenvolvimento de ‘Duke 7’ quando armazenado por seis meses. As sementes foram desinfestadas (NaOCl 1,5%) por 30 minutos e armazenadas (10,3 °C ± 0,5 e 62,8% ± 4,2 UR). Após armazenamento, em câmara de fluxo laminar, os eixos foram extraídos e dispostos no meio de cultivo e mantidos em sala de crescimento (22 °C; 11,4 µm.m².s⁻¹ (± 2,66) e 89% UR (interior do frasco). O delineamento experimental foi completamente aleatorizado, com quatro repetições. Realizou-se análise de variância e comparação de médias (Scott-Nott test ($p \leq 0.05$)). No embrião e eixo embrionário, mediu-se: comprimento (mm), largura (mm) e massa (g), assim como calculada a relação do tamanho entre eles. Dos embriões armazenados foi quantificado o percentual de: sobrevivência, enraizamento e eixos em roseta. Como resultado, sementes de ‘Duke 7’ foram mais compridas e pesadas, apesar de que isso não resulta em embriões de maior tamanho. Dos testes de desenvolvimento *in vitro*, sem armazenamento para ‘Duke 7’ houve maior sobrevivência no SHm e enraizamento foi menor apenas no MS. No ‘Toro canyon’ a sobrevivência e o desenvolvimento não foram afetados pela composição do meio, mas o enraizamento foi menor no SHm. No armazenamento por dois meses, dos efeitos simples nem o método de embalagem nem a composição do meio afetou o percentual de sobrevivência e enraizamento, apenas o número de explantes em estado de roseta, menor no MS. Dos eixos de ‘Duke 7’ armazenados por seis meses, 93% das estruturas conservaram-se viáveis para cultivo *in vitro*. Sugere-se que o armazenamento de embriões para desenvolvimento de eixos *in vitro* é viável, mas isto depende da composição do meio mais do que a variabilidade biométrica das sementes.

Palavras-chave: abacateiro, germinação *in vitro*, meio de cultivo, micropropagação

CHAPTER 5 – Determination of viability and *in vitro* development of embryonic axes after storage of *Persea americana* embryos

ABSTRACT – Obtaining of seedlings of *Persea americana* Miller used as rootstocks should be considering the innocuity, development, response to environmental conditions, and other factors, and these can differ when produced clonally or from seed. The use of successful micro-propagation techniques can result in healthy plants with the specific genotype needed for cloning. In avocado, the establishment of *in-vitro* explants from mature plants is a major difficulty in reaching this objective and the use of MS, SH and WPM has been referred. Using *P. americana* 'Toro canyon' and 'Duke 7' in the present work, the biometric variability of embryos and the embryonic axes were compared. Under *in-vitro* conditions, the development of embryonic axes in MS, MS 30% or SHm culture medium was compared with or without previously storing (two months, 10 °C) the embryos in plastic bags, with or without holes. In addition, the *in-vitro* development of 'Duke 7' embryos after storing for 6 mo was assessed. The seeds were disinfested (1.5% NaOCl, 30 min), then stored (10.3 ± 0.5 °C and $62.8\% \pm 4.2$ RH). Then, within a laminar flow chamber, the embryonic axes were excised and placed into a culture and incubated in a growth room (22 °C, 11.4 ± 2.66 $\mu\text{m}/\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$, and 89% RH, inside the flask). A completely randomized design was used with four replicates. Analyses of variance were performed with means separation (Scott-Nott test $p \leq 0.05$). For the embryo and embryonic axes, lengths, widths, and masses were measured and relationships of embryo to embryonic axis size were calculated. For embryos growing under *in-vitro* conditions, percentage survival and rooting and apical development were determined. As results, seeds of 'Duke 7' were larger and heavier than of 'Toro canyon', although the embryos did not differ in size. For tests of *in-vitro* development without storage, 'Duke 7' had its highest survival rate in SHm medium and the least rooting was in MS. 'Toro canyon', survival and development were not affected by medium, but its rooting was lowest in the modified SH medium. Considering embryos stored for two months, there was no interaction between the factor; however, the number of explants in rosette stage was lowest from the MS medium. For 'Duke 7' embryonic axes stored for 6 mo, 93% remained viable for *in-vitro* cultivation. Overall, results of this research suggest that avocado *in vitro* development after storing of embryos is feasible, and it depends more on the cultural medium composition than on biometric variability of seeds.

Keywords: avocado, *in-vitro* germination, cultural medium, micro-propagation

5.1 Introdução

Persea americana Miller é originária da América central e encontra-se distribuída também na América latina, Estados Unidos, Espanha, África do Sul, Haiti, Austrália (SCORA; BERGH, 1990; AYALA SILVA; LEDESMA, 2014). A área mundial destinada para esta cultura é aproximadamente de 500.000 ha, sendo que no Brasil existem aproximadamente 11.000 ha, dos quais o estado de São Paulo com 54% é o principal produtor (DORIZZOTTO et al., 2011).

Comercialmente, para produção de mudas utiliza-se majoritariamente mudas por enxertia da variedade comercial sobre porta-enxerto, entanto que o uso da micropropagação ainda é pequeno (ERNST; WHILEY; BENDER, 2013). Para propagação *in vitro* de *Persea americana*, estudos em diversos sentidos têm sido desenvolvidos no intuito de obter mudas com fins de propagação e melhoramento (PLIEGO-ALFARO et al., 1999; RAHARJO; LITZ, 2005; FUENTES et al., 2013; ALMARAZ-SÁNCHEZ; ALVARADO-ROSALES; SAAVEDRA-ROMERO, 2013; ENCINA et al., 2014).

Dentre as técnicas usadas na micropropagação, encontra-se o desenvolvimento *in vitro* de embriões isolados em meio de cultura, usado em muitas outras espécies, seja como fase prévia para desenvolvimento de mudas ou como para resgate de material genético de interesse (RAGHAVAN, 2003). Em condições *in vitro* a técnica possibilita o desenvolvimento e formação de mudas sadias e axênicas para microenxertia (PLIEGO-ALFARO; MURASHIGE, 1987; RAHARJO; LITZ, 2005), assim como para estudos fisiológicos e de conservação de germoplasma.

Diferente de outras espécies, o abacateiro é uma espécie mono-embriônica (MORAIS et al., 2010) e de sementes recalcitrantes (ROBERTS; KING, 1980), o que, no melhoramento genético, limita a taxa de obtenção de indivíduos de um único cruzamento, além da reduzida possibilidade de se manter viáveis após armazenamento.

Os primeiros trabalhos com eixos embrionários de *Persea americana* relataram e exploraram o potencial de aproveitamento desta fase da planta na propagação (POPENOE; BUTLER, 1928; TRAUB; AUCHTER, 1933), sendo ainda mais viável ao se incorporar a utilização de técnicas *in vitro*, uma vez que reduz os altos custos da

técnica.

Assim, observa-se que trabalhos para o desenvolvimento *in vitro* de eixos embrionários de abacateiro são escassos e existem limitações associadas ao completo desenvolvimento das estruturas, bem como ao tipo de meio de cultivo para as fases subsequentes (SÁNCHEZ-ROMERO et al., 2007; MÁRQUEZ-MARTÍN et al., 2009; FUENTES et al., 2013; ENCINA et al., 2014).

Apesar de que não se conhecem resultados de desenvolvimento *in vitro* dos eixos após conservação das sementes, porém sabe-se, por exemplo, que alguns tratamentos prévios, como a dessecação parcial das sementes, ao longo do tempo podem afetar positivamente a germinação (MÁRQUEZ-MARTÍN et al., 2009).

Em relação ao meio de cultivo, o MS 100% (MURASHIGE; SKOOG, 1962) não é recomendado na micropropagação de abacateiro, pois tem sido associado a desordens fisiológicas, alterações ou redução no desenvolvimento dos explantes, sugerindo-se o uso da concentração reduzida de macro-elementos do MS ou composições como *Wood Plant Medium* - WPM (LLOYD; McCOWN, 1981) ou SH (SCHENK; HILDEBRANDT, 1972) modificado de Schenk e Hildebrandt (1972), Harty (1985) e Pliego-Alfaro e Murashige (1987).

Em concordância com o anteriormente exposto, no presente trabalho apresentam-se resultados do desenvolvimento dos eixos embrionários de abacateiro, sob condições *in vitro*, em função da composição do meio de cultivo e do armazenamento das sementes.

5.2 Material e Métodos

Para os três testes detalhados a seguir foram utilizadas sementes extraídas de frutos maduros dos materiais de abacateiro ‘Toro canyon’ e/ou ‘Duke 7’, segundo o teste, pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma e os experimentos realizados no Laboratório de Micropropagação de Hortícolas do Departamento de Produção Vegetal - FCAV – UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

5.2.1 Variabilidade morfológica em embriões de abacateiro ‘Toro canyon’ e ‘Duke 7’

Para determinação da massa dos embriões e a relação embrião-semente, 50 frutos maduros sadios dos materiais avaliados foram coletados e levados para o laboratório referido anteriormente. Após remoção da polpa, as sementes foram lavadas em água corrente para retirada do epicarpo e enxugadas superficialmente.

Para mensuração do eixo embrionário, com ajuda de uma espátula para dissecção de alumínio, realizou-se leve força na região apical da semente no ponto de união cotiledonar até completa separação. Seguidamente com ajuda de bisturi, o eixo embrionário foi separado cuidadosamente pela base (Figura 34).

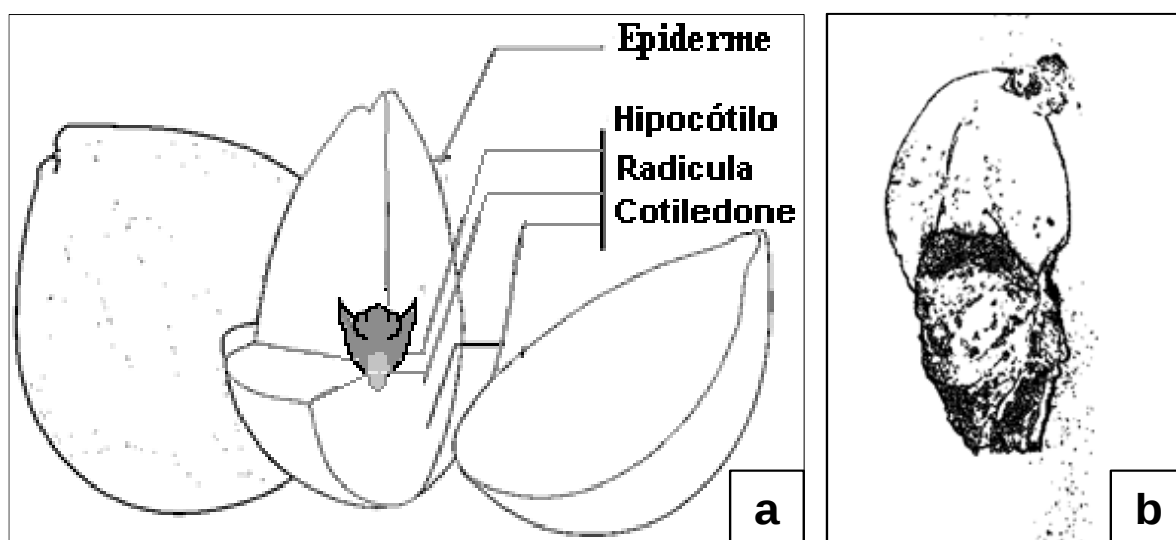


Figura 34. Desenho de embrião e eixo embrionário de abacateiro para extração e estabelecimento *in vitro*. a: Partes do embrião com a região de união cotiledonar, b. Eixo embrionário separado usado para estabelecimento *in vitro*. 2016. Adaptado de Lady of Hats- avocado seed.

Foram mensurados o comprimento e largura (mm), a massa (g), assim como calculada a correlação entre o tamanho da semente e do eixo embrionário.

5.2.2 Testes de armazenamento de embriões e posterior viabilidade para desenvolvimento *in vitro* dos eixos embrionários

Sementes foram obtidas do local e seguindo o procedimento descrito anteriormente para seu preparo e armazenamento. Logo após, imersas em solução de NaOCl (1,5% i.a) por 30 minutos e então colocadas no meio ou na condição testada

para armazenamento.

Após o período de armazenamento testado, as sementes foram novamente submersas em solução de NaOCl (1,5% i.a) por 20 minutos e, em condições axênicas, submetidas a tríplex enxágue com água deionizada autoclavada (30 minutos a 1,2 Atm). Para obtenção do eixo, semente foi separada pela região de união, mas sem tecido cotiledonar, retirado o eixo embrionário completamente (Figura 35) e finalmente disposto individualmente no meio de cultivo em frasco de vidro de 200 mL contendo 25 mL de meio de cultivo, e tampados com filme plástico de polietileno (0,910-0,940 g.cm³).

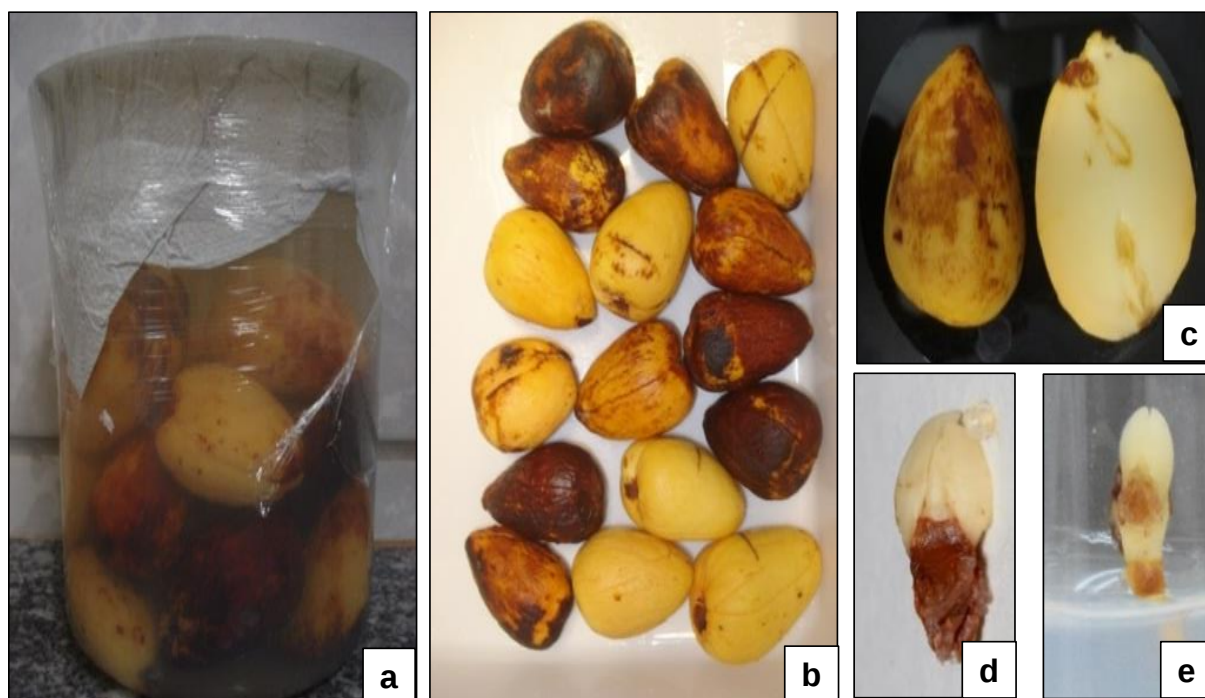


Figura 35. Preparo de sementes de abacateiro para armazenamento e estabelecimento *in vitro* de eixos embrionários. a: Imersão em NaOCl (1,5% i.a); b. Sementes após desinfestação; c. Separação para extração do eixo embrionário; d. Eixo embrionário; e. Desenvolvimento inicial em meio de cultivo.

As condições da sala de crescimento para o desenvolvimento dos explantes foram: irradiância 11,4 ($\pm 2,66$) $\mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$, e as condições de desenvolvimento mensuradas no interior do frasco, utilizando termo-higrômetro Instruterm® HT-500, foram: temperatura 22,0 °C ($\pm 0,7$) e umidade relativa 95,43 % ($\pm 0,7$).

5.2.3 Armazenamento do embrião e meio de cultivo no desenvolvimento *in vitro* de eixos embrionários

Eixos embrionários de materiais 'Duke 7' e 'Toro canyon' foram obtidos seguindo a metodologia descrita anteriormente para comparar, tanto sem armazenamento como pelo efeito após armazenados por dois meses, o seu desenvolvimento *in vitro* em três meios de cultivo: MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), MS modificado (30% macro nutrientes) e SHm (SCHENK; HILDEBRANDT, 1972).

O armazenamento realizou-se em câmeras tipo BOD a $10,3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ e $62,8\text{ \%} \pm 4,2$ UR, no escuro. Foram dispostas duas sementes por saco de papel kraft (100g.m² capacidade 0,5 kg) e 10 desses em duplo saco plástico transparente (1,10-1,35 g.cm³), hermeticamente fechado ou perfurado (aproximadamente 100 furos de 1 mm de diâmetro), segundo ilustrado na Figura 36.



Figura 36. Procedimento geral do preparo das sementes de abacateiro. 'Duke 7' para armazenamento (10°C) por 60 dias em saco plástico.

Após 60 dias de estabelecimento no meio de cultivo foi avaliada a porcentagem de: sobrevivência, enraizamento, desenvolvimento do meristema apical e no estado de roseta (Figura 37). O experimento foi em delineamento completamente ao acaso e a unidade experimental constituída por dez frascos com explante individual. Foi realizada análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

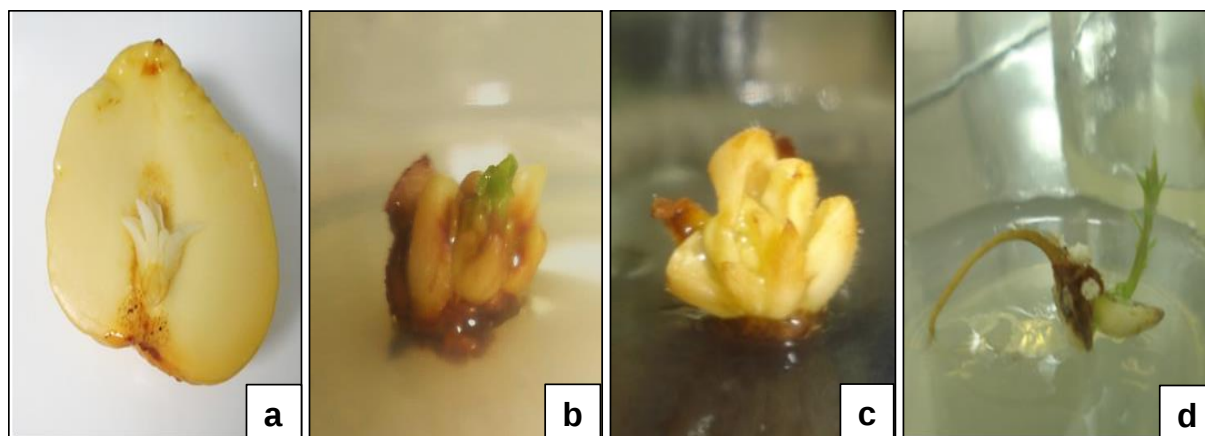


Figura 37. Desenvolvimento *in vitro* de eixos embrionários de abacateiro 'Toro canyon' em meio de cultivo semissólido. a) separação para extração do eixo embrionário; b) desenvolvimento apical; c) fase de roseta; d) enraizamento e desenvolvimento apical.

5.2.4 Viabilidade de eixos embrionários de embriões de abacateiro 'Duke 7' armazenados por seis meses

Prévio armazenamento do material seguiu-se a metodologia geral descrita para o preparo das sementes. Para o armazenamento as sementes foram dispostas em caixas plásticas hermeticamente fechadas no escuro por seis meses (10 °C e 63% UR). Após o tempo de armazenamento, em câmara de fluxo laminar, os eixos embrionários foram extraídos e colocados em meio de cultivo SHm (Figura 38), mantidos em sala de crescimento nas condições descritas anteriormente.



Figura 38. Sequência geral do preparo para armazenamento de embriões de abacateiro em BOD (10 °C) por seis meses.

O experimento foi disposto em delineamento inteiramente ao acaso com quatro repetições de oito eixos embrionários como unidade experimental. Para normalizar os resíduos, os dados foram transformados ($\text{Arcsen } \sqrt{x/2}$). Realizou-se comparação de médias pelo teste F e, quando diferentes, foi realizada análise de regressão ($p \leq 0,05$). As variáveis analisadas foram o percentual de sobrevivência, enraizamento e explantes em fase de roseta, durante 65 dias a partir do estabelecidos no meio.

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Variabilidade morfológica em embriões de abacateiro ‘Toro canyon’ e ‘Duke 7’

As características físicas das partes que constituem a semente podem constituir o tipo de limitante na germinação denominada dormência física (RAJJOU et al., 2012; PAULSEN et al., 2013). Os dois materiais apresentam, típicas das recalcitrantes, sementes grandes (VON TEICHMAN; VAN WYK, 2008) sendo que as sementes de ‘Duke 7’ são, em média, mais pesadas e alongadas, com o eixo embrionário do mesmo tamanho, porém mais leve, quando comparadas com as de ‘Toro canyon’, o que faz com que a relação entre a massa da semente e o eixo seja menor no ‘Duke 7’ em comparação com ‘Toro canyon’ (Tabela 19).

Tabela 19. Biometria de eixos embrionários dos materiais ‘Duke 7’ e ‘Toro canyon’ de abacateiro.

	Semente			Eixo embrionário			R.M
	Altura (mm)	Diâmetro (mm)	Massa (g)	Altura (mm)	Diâmetro (mm)	Massa (g)	E/Ee
Toro canyon	43,03 b	31,74 ns	25,20 b	10,03 ns	5,43 ns	0,10 a	0,40 a
Duke 7	49,66 a	32,34	30,47 a	10,3	5,68	0,08 b	0,27 b
P (0,05)	<0,001	0,330	<0,001	0,567	0,41	0,027	<0,001

Letras em cada coluna mostram diferença significativa pelo teste Scott-knott ($p \leq 0,05$) quando significativo ao nível de significância de 5% pelo teste F. NS = não significativo; R.M S/Ee: Relação entre a massa do embrião e o eixo embrionário.

Segundo Adjei, Banful e Idun (2011) o desenvolvimento convencional de mudas é afetado, entre outras, pelo tamanho da semente, enquanto Sánchez-Romero et al. (2007) sugerem que o tamanho dos cotilédones pode também incidir na protrusão dos

eixos embrionários. O verificado neste presente trabalho foi a variação no tamanho do eixo embrionário entre uma população de sementes (Figura 39) é que nem sempre sementes maiores são constituídas de eixos maiores, sendo que a correlação do tamanho cotilédone/eixo embrionário foi não significativa no 'Duke 7' (0,917) e significativa no Toro canyon ($P=0,049$), cujo coeficiente de correlação de Pearson ($P > 0,050$) foi 0,018 e 0,335, respectivamente.

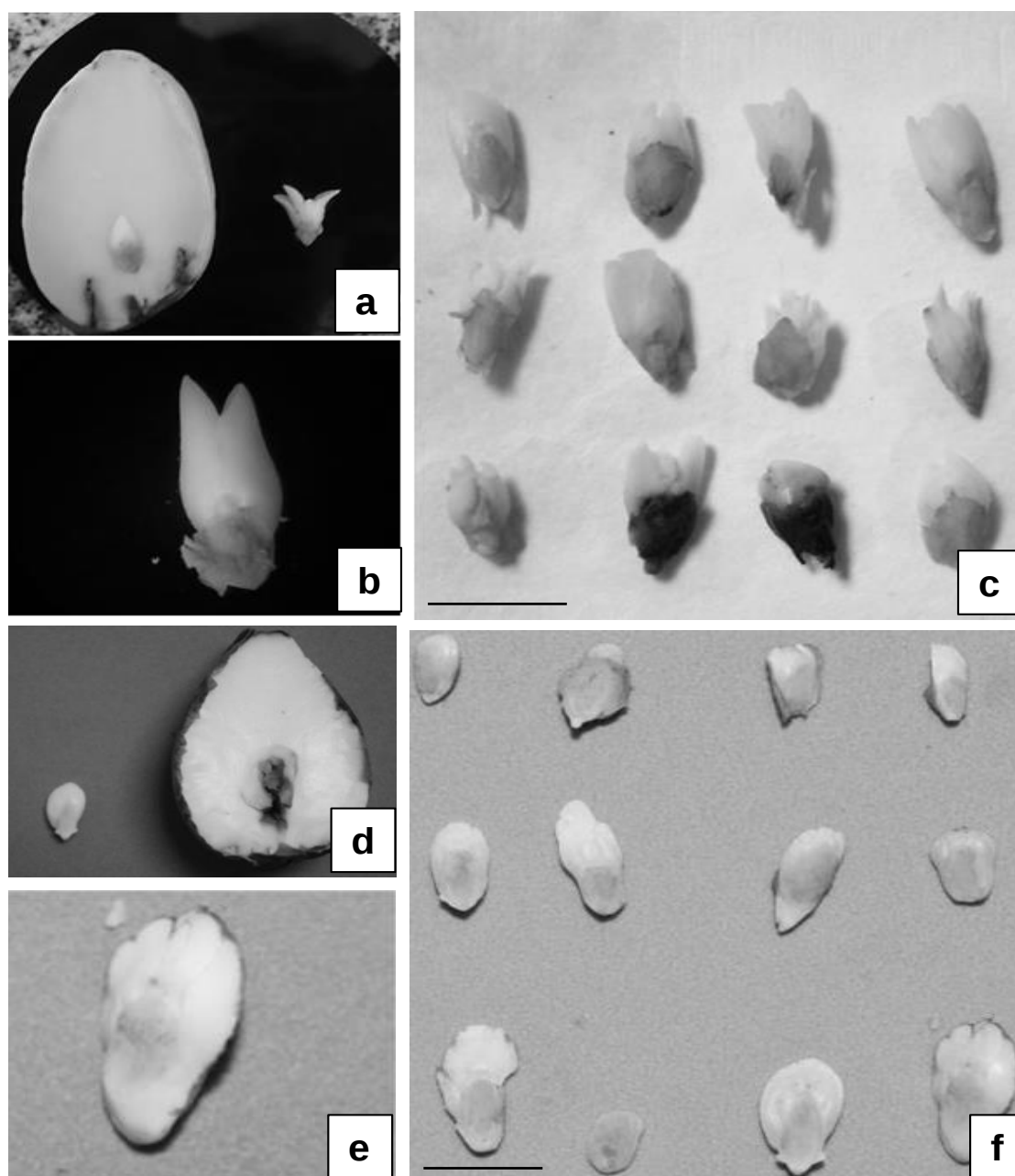


Figura 39. Aspecto do embrião e variação morfológica do eixo embrionário de abacateiro 'Duke 7' (a, b, c) e 'Toro canyon' (d, e, f), (barra = 1cm).

5.3.2 Armazenamento do embrião por dois meses e meio de cultivo no desenvolvimento *in vitro* de eixos embrionários

Para o teste sem armazenamento, nos dados analisados ao longo do tempo, tanto no 'Toro canyon' quanto no 'Duke 7' não houve interação entre os fatores. Considerando os efeitos simples, para o 'Duke 7' a sobrevivência ($P=0,019$) e o enraizamento ($P=0,006$) diferiu entre os meios (Figuras 40a e 40b) enquanto que o número de explantes em roseta não diferiu ($P=0,272$). Para o 'Toro canyon' houve diferença entre os meios de cultivo no enraizamento ($P=0,020$) (Figura 40c), mas não na sobrevivência ($P=0,272$) nem explantes em fase de roseta ($P=0,260$). As médias e os modelos ajustados da análise de regressão são apresentados na Tabela 20.

Tabela 20. Porcentagem média de sobrevivência, enraizamento e desenvolvimento *in vitro* de eixos embrionários sem armazenamento de abacateiro 'Duke 7' e 'Toro canyon' em meio de cultivo após 60 dias de incubação.

Material	Média (%)	Modelo ajustado (Y=)	CV (%)
'Toro canyon'			
Vivos	99	----	4,52
Enraizados	----	$0,485 + 0,027x - 0,0004 X^2$	11,38
Roseta	13	$2,8225 - 0,3789x + 0,0199 X^2$	25, 32
'Duke 7'			
Vivos	---		22,92
Enraizados	---	$-0,0516 + 0,0134x + 0,0001 X^2$	45,76
Roseta	57	$1,1712 + 0,0967 - 0,0011 X^2$	20,97

Modelo ajustado significativo ao nível de significância de 5% pelo teste F; --- = ns.

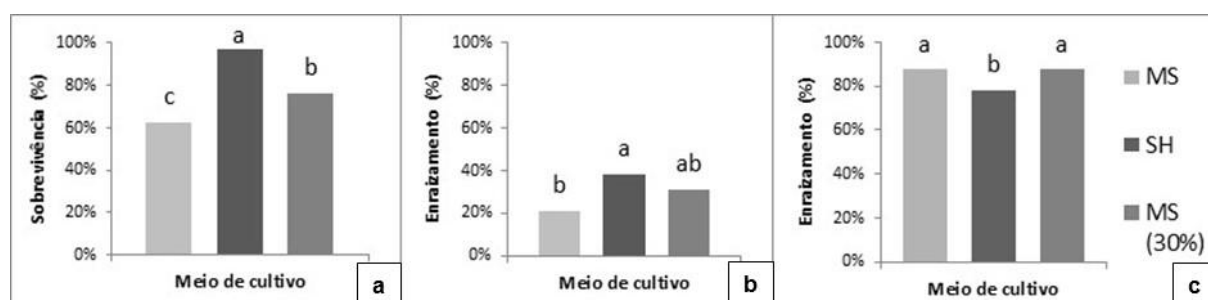


Figura 40. Sobrevivência e enraizamento de eixos embrionários de abacateiro sem armazenamento sob condições *in vitro* nos meios de cultivo MS, MS (30%) e SHm. a, b: 'Duke 7'; c: 'Toro canyon'. *Letras nas barras mostram diferença significativa pelo teste Scott-knott ($p \leq 0,05$) quando significativo ao nível de significância de 5% pelo teste F.

No teste de desenvolvimento dos eixos das sementes de 'Duke 7' após armazenamento por 60 dias, a taxa de desenvolvimento de estruturas completas dos eixos embrionários variou em função da composição do meio de cultivo, mas quando comparada a interação com o método de armazenamento, após 60 dias de avaliação, não houve interação sobre: porcentagem de sobrevivência ($P=0,145$); porcentagem de enraizamento ($P=0,210$) e porcentagem de explantes em roseta ($P=0,107$).

Para os efeitos simples, em nenhuma das variáveis avaliadas, enraizamento ($P=0,104$) sobrevivência ($P=0,116$) e eixos em fase de roseta ($P=0,431$), houve diferença comparando o método de armazenamento. Entre o meio de cultivo, houve diferença apenas na porcentagem de explantes em estado de roseta ($P=0,001$), sendo menor no meio MS (28%), enquanto que entre o meio MS30% e SHm não houve diferença, sendo em média de 52%. A porcentagem de explantes vivos ($P=0,620$) e enraizados ($P=0,085$) não diferiu entre os meios de cultivo, sendo, em média, 97% ($CV=5,72\%$) e 70% ($CV=27,09\%$), respectivamente.

O observado nos resultados em relação à composição do meio de cultivo, mostra que esta incide diretamente na resposta morfogênica do tecido sob condições *in vitro*, conforme também relatado em outras pesquisas (VIÑA et al., 1999; KOZAI; AFREEN; ZOBAYED, 2005; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ et al., 2009).

A composição de um meio de cultivo, entre outras coisas, depende também da relação e concentração de macro e micronutrientes e suas formas iônicas, assim como vitaminas e reguladores de crescimento adicionados (MURASHIGE, 1973; GEORGE; HALL; KLERK, 2008a).

Por sua vez, a diferença entre os meios MS e MS 30% é a redução na porcentagem dos macronutrientes. No MS os principais constituintes são KNO_3 e NH_4NO_3 , seguido de $CaCl_2$ e $MgSO_4$ (Figura 41a) enquanto que no SHm é o KNO_3 , seguido de $MgSO_4$ e o NH_2HPO_4 (Figura 41b), evidenciando que a principal diferença se encontra na menor concentração total de sais, a variação na relação NH_4/NO_3 e na relação $Ca + Mg/K$ (Figura 41c).

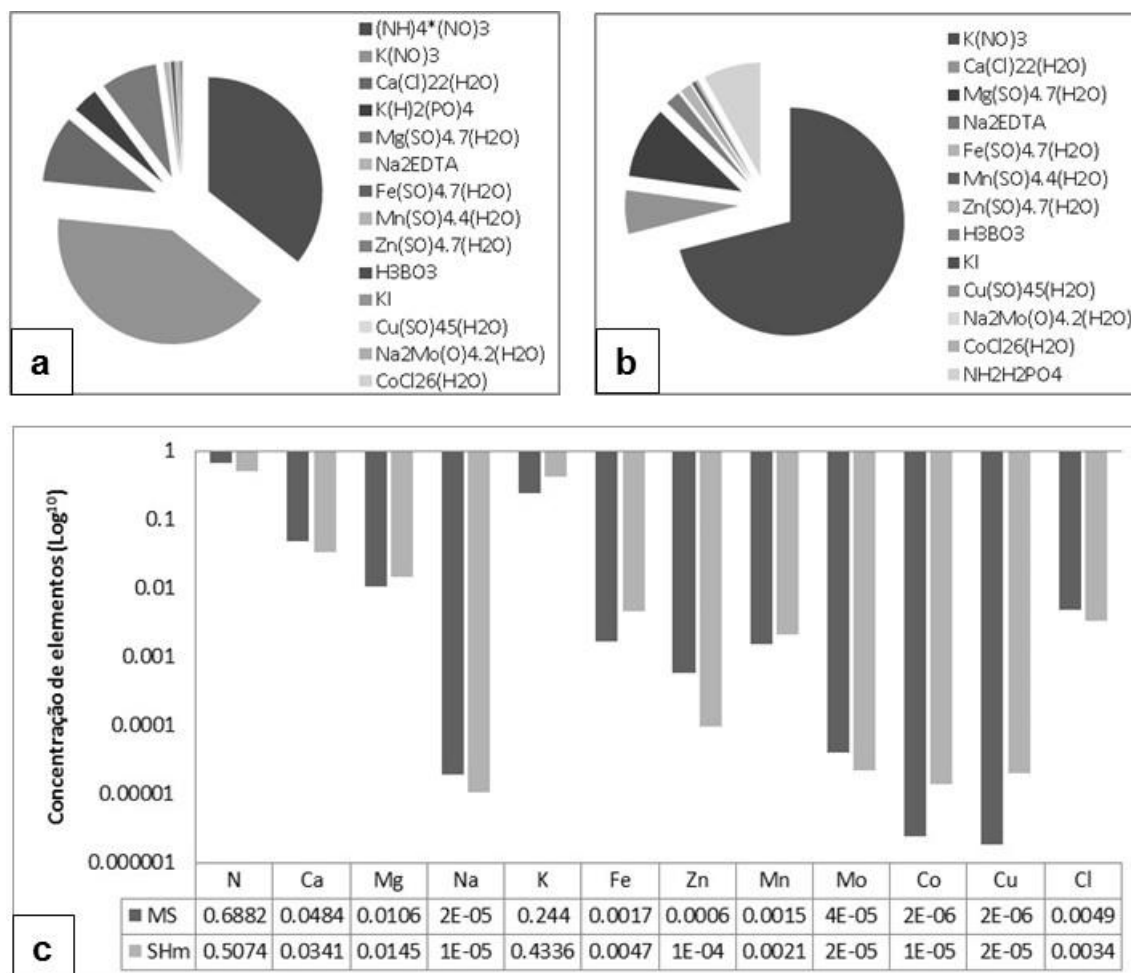


Figura 41. Comparação dos principais sais (a, b) e elementos químicos constituintes (c) entre o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e o SHm (SCHENK; HILDEBRANDT, 1972).

No meio MS, a concentração do NO_3^- é maior que do NH_4^+ e sua proporção do N em relação a íons como Ca^{2+} e Mg^{2+} é alta (40 e 20:1, respectivamente). Assim, em termos de concentração iônica e proporção com os demais no meio de cultivo, esta variação pode estar relacionada com a iniciação, crescimento e diferenciação dos explantes *in vitro*, segundo relatado por Leifert, Murphy e Lumsden (1995), Hajari, Snyman e Watt (2015) e Wada, Nierz e Reed (2015).

Em abacateiro, fatores como maturidade da semente, presença de tecido cotiledonar e constituintes do meio de cultivo, como carvão ativado e reguladores de crescimento, podem interferir no desenvolvimento *in vitro* (SKENE; BARLASS, 1983; SÁNCHEZ-ROMERO et al., 2007; FUENTES et al., 2013). Da composição do meio, o uso do meio MS tem se associado a desordens fisiológicas e sintomas de fitotoxidez,

entanto que meios com concentrações reduzidas e variações na relação de macronutrientes e outras fontes de nitrogênio favoreçam a desdiferenciação dos embriões (HARTY, 1985; PLIEGO-ALFARO; MURASHIGE, 1987; RAHARJO; LITZ, 2003). Finalmente, fatores genéticos devem ser considerados, pois em outras espécies frutíferas, tais como macieira, coqueiro, citros, e outros, a diferenciação e desenvolvimento de órgãos a partir de gemas, embriões, e outras estruturas vegetativas em função da variação na composição do meio, foi genótipo-dependente (DANTAS et al., 2006; THORPE; YEUNG, 2011; WADA; NIEDZ; REED, 2015).

5.3.3 Viabilidade de eixos embrionários de embriões de abacateiro ‘Duke 7’ armazenados por seis meses

O percentual de sobrevivência não diferiu durante o período de avaliação ($P > 0.050$) sendo em média, de 93%. Durante 65 dias de incubação a variação no tempo de avaliação e no desenvolvimento radicular ajustou-se no modelo quadrático ($P = 0,022$), assim como o dos explantes em estado de roseta ($P = 0,230$), tal como apresentado na Figura 42.

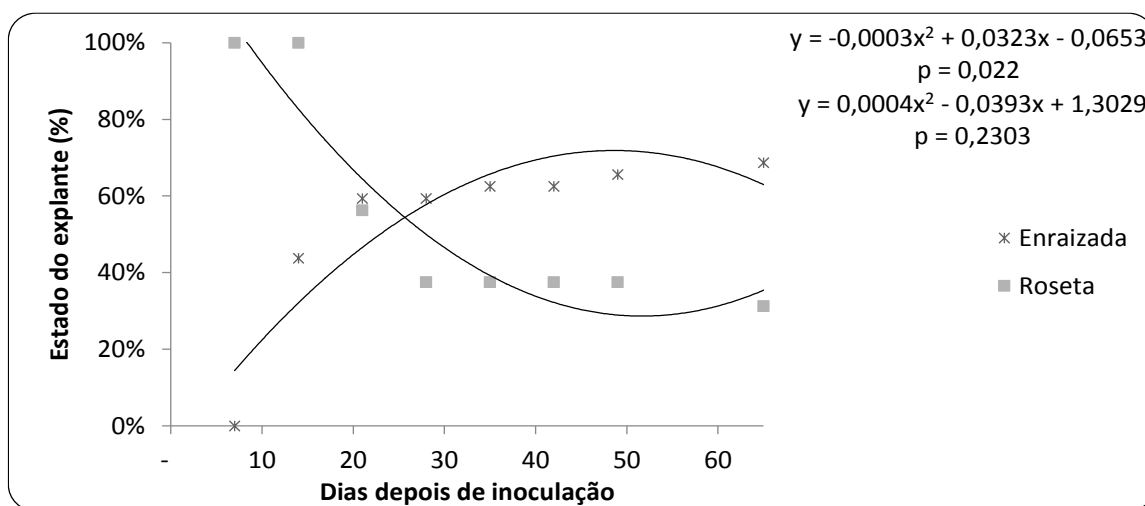


Figura 42. Regressão da análise de variância do desenvolvimento da parte aérea e radicular de eixos embrionários de abacateiro ‘Duke 7’.

O armazenamento das sementes depende das propriedades intrínsecas da espécie, de acordo com sua condição recalcitrante, ortodoxa ou intermediária (VON TEICHMAN; VAN WYK, 2008). As sementes de abacateiro são consideradas

recalcitrantes (ROBERTS; KING; 1980), no entanto, o desenvolvimento completo na germinação de sementes de 'Fuerte' após armazenamento em sacos plásticos a 8°C permitiu a manutenção da porcentagem de germinação acima de 80% durante três meses (NEVES; MOREIRA, 1991). Por outro lado, o armazenamento em recipiente de vidro fechado sob baixa temperatura (3 °C e 10 °C), possibilitou 65% de germinação após armazenadas por 12 meses (AROEIRA, 1962).

O processo de armazenamento de sementes é dinâmico e variável toda vez que depende de fatores como o tamanho da semente, estado nutricional da planta matriz, tipo de reserva, entre outras (BONNER; KARRFALT, 2008). O tipo de embalagem para armazená-las é considerado fator importante, pois afeta a variação e concentração de gases, tais como nitrogênio e oxigênio, na atmosfera da semente (HONG; ELLIS, 1995; BONNER; KARRFALT, 2008), sendo que a redução deste último favorece a diminuição do metabolismo e incrementa a longevidade das sementes (BONNER; KARRFALT, 2008) o que pode ter favorecido a viabilidade dos eixos embrionários de abacateiro após os seis meses de armazenamento.

5.4 Conclusões

A relação da massa: embrião/eixo embrionário foi diferente entre 'Duke 7' e 'Toro canyon'; sendo que a variação foi apenas na massa dos os embriões.

O armazenamento de sementes a 10 °C para desenvolvimento *in vitro* dos eixos, até dois meses, pode ser feito em saco plástico com ou sem perfurações.

A incidência no desenvolvimento *in vitro* de eixos embrionários de abacateiro foi diferente entre os materiais.

Eixos embrionários de 'Duke 7' mantêm-se viáveis para cultivo *in vitro* mesmo após seis meses de armazenamento dos embriões.

5.5 Referências

ADJEI, P. Y.; BANFUL, B. K.; IDUN, I. A. Seed size and seed cut-length effects on germination behavior and seedling growth of avocado (*Persea americana* Merr.). **International Journal of Agricultural Research**, New York, v. 6, n. 3, p. 299–305, 2011.

ALMARAZ-SÁNCHEZ, A.; ALVARADO-ROSALES, D.; SAAVEDRA-ROMERO, L. D. L. Trampeo de *Phytophthora cinnamomi* en bosque de encino con dos especies ornamentales e inducción de su esporulación. **Revista Chapingo**, Chapingo, v. 19, n. 1, p. 5–12, 2013.

AROEIRA, J. S. Dormência e conservação de sementes de algumas plantas frutíferas. **Experimentae**, Viçosa, v. 2, n. 3, p. 541–609, 1962.

AYALA SILVA, T.; LEDESMA, N. Avocado History, Biodiversity and Production. In: NANDWANI, D. (Ed.). **Sustainable horticultural systems: issues, technology and innovation**. Sustainable development and biodiversity. Heidelberg: Springer International Publishing, 2014. v. 2, p. 157–205.

BONNER, F. T.; KARRFALT, R. P. (Eds.). **The woody plant seed manual**. Washington: Government Printing Office, 2008. 1223 p.

DANTAS, A. C. M.; BONETI, J. I.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Embryo rescue from interspecific crosses in apple rootstocks. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 41, n. 6, p. 969–973, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2006000600011>>.

DORIZZOTTO, C. D. A.; SAMPAIO, A. C. ICUMA, I. M.; YAMANISHI, O. K. Avocado production chain in the state of São Paulo (Brazil). In: WORLD AVOCADO CONGRESS, 7., 2011, Cairns, Australia. **Anais...** Cairns: Avocados Australia, 2011. CD-ROM.

ENCINA, C. L.; PARISI, A.; O'BRIEN, C.; MITTER, N. Enhancing somatic embryogenesis in avocado (*Persea americana* Mill.) using a two-step culture system and including glutamine in the culture medium. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 165, p. 44–50, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2013.10.019>>.

ERNST, A. A.; WHILEY, A. W.; BENDER, G. S. Propagation. In: SCHAFFER, B.; WOLSTENHOLME, B. N.; WHILEY, A. W. (Eds.). **The avocado: botany, production and uses**. 3rd ed. Wallingford: CABI, 2013. p. 234–267.

FUENTES, J. L.; RODRÍGUEZ, N. N.; SANTIAGO, L.; VALDÉS, Y.; RAMÍREZ, I. M.; RODRÍGUEZ, J. A. Zygotic embryo culture in avocado (*Persea americana* Mill.). **Cultivos Tropicales**, San Jose de las Lajas, v. 25, n. 3, p. 73–76, 2013.

HAJARI, E.; SNYMAN, S. J.; WATT, M. P. Nitrogen use efficiency of sugarcane (*Saccharum spp.*) varieties under *in vitro* conditions with varied N supply. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 122, n. 1, p. 21–29, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11240-015-0746-y>>.

HARTY, P. A. Propagation of avocado by tissue culture: development of a culture medium for multiplication of shoots. **South African Avocado Growers' Association Yearbook**, Limpopo, v. 8, p. 70–71, 1985.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. **A protocol to determine seed storage behaviour**. Roma: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. 62 p. (Boletim, 1).

KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A. **Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system**. Berlin: Springer Netherlands, 2005. 316 p.

LEIFERT, C.; MURPHY, K. P.; LUMSDEN, P. J. Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. **Critical Reviews in Plant Sciences**, New York, v. 14, n. 2, p. 83–109, 1995.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. **Proceedings International Plant Propagator's Society**, Ashville, v. 30, p. 421–426, 1981.

MÁRQUEZ-MARTÍN, B.; GUZMÁN-GARCÍA, E.; BARCELÓ-MUÑOZ, A.; PLIEGO-ALFARO, F.; SÁNCHEZ-ROMERO, C. Effects of an *in vitro* maturation treatment on plant recovery from avocado zygotic embryos. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 122, n. 4, p. 532–539, 2009.

MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, M. D. J.; LÓPEZ, A. A.; OSORIO-ACOSTA, F.; LÓPEZ, F. G.; MOCTEZUMA, H. L.; ROSAS, M. M. Evaluación de diferentes fuentes de carbohidratos y medios de soporte, para la multiplicación *in vitro* de portainjertos de cítricos tolerantes a la tristeza. **Agronomía Tropical**, Maracay, v. 59, n. 3, p. 343–350, 2009.

MORAIS, I. V.; COSTA, R. S.; MÔRO, F. V.; MARTINS, A. B. G.; SILVA, R. R. S. Caracterização morfológica do fruto, da semente e desenvolvimento pós-seminal do abacateiro. **Comunicata Scientiae**, Bom Jesus, v. 1, n. 1, p. 69–73, 2010.

MURASHIGE, T. Nutrition of plant cells and organs *in vitro*. **In Vitro**, Heidelberg, v. 9, n. 2, p. 81–85, 1973.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.

NEVES, C. S. V. J.; MOREIRA, C. S. Avaliação de Métodos para Conservação de Sementes de Abacateiro (*Persea* sp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 13, n. 1, p. 117–122, 1991.

PAULSEN, T. R.; COLVILLE, L.; KRANNER, I.; DAWS, M. I.; HÖGSTEDT, G.; VANDVIK, V.; THOMPSON, K. Physical dormancy in seeds: a game of hide and seek? **New Phytologist**, West Sussex, v. 198, n. 2, p. 496–503, 2013.

PLIEGO-ALFARO, F.; BARCELÓ-MUÑOZ, A.; SIMÓN-PÉREZ, E.; VIÑA-NIETO, G.; SÁNCHEZ-ROMERO, C.; PERÁN-QUESADA, R. La micropropagación en la mejora de patrones de aguacate (*Persea americana* Mill): problemas y limitaciones. **Revista Chapingo**, Chapingo, v. 5, p. 239–244, 1999.

PLIEGO-ALFARO, F.; MURASHIGE, T. Possible rejuvenation of adult avocado by graftage onto juvenile rootstocks *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v. 22, n. 6, p. 1321–1324, 1987.

POPENOE, W.; BUTLER, A. F. Propagation de l'Avocatier. **Revue de Botanique Appliquée et D'Agriculture Coloniale**, Paris, v. 8, n. 83, p. 478–482, 1928.

RAGHAVAN, V. One hundred years of zygotic embryo culture investigations. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Heidelberg, v. 39, n. 5, p. 437–442, 2003.

RAHARJO, S. H. T.; LITZ, R. E. Rescue of genetically transformed avocado by micrografting. In: WORLD AVOCADO CONGRESS, 5., 2003, Granada, Spain. **Anais...** Granada: ACTAS, 2003. p. 119–122.

RAHARJO, S. H. T.; LITZ, R. E. Micrografting and ex vitro grafting for somatic embryo rescue and plant recovery in avocado (*Persea americana*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 82, n. 1, p. 1–9, 2005.

RAJJOU, L.; DUVAL, M.; GALLARDO, K.; CATUSSE, J.; BALLY, J.; JOB, C.; JOB, D. Seed germination and vigor. **Annual Review of Plant Biology**, Palo, Alto, v. 63, p. 507–533, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105550>>.

ROBERTS, E. H.; KING, M. W. Storage of recalcitrant seeds. In: WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. (Eds.). **Crop genetic resources**. The conservation of difficult material. Paris: International Union of Biological Sciences, 1980. p. 39–48.

SÁNCHEZ-ROMERO, C.; PERÁN-QUESADA, R., MÁRQUEZ-MARTÍN, B.; BARCELÓ-MUÑOZA, A.; PLIEGO-ALFARO, F. *In vitro* rescue of immature avocado (*Persea americana* Mill.) Embryos. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 111, n. 4, p. 365–370, 2007.

SCHENK, R. U.; HILDEBRANDT, A. C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 50, n. 1, p. 199–204, 1972.

SCORA, R. W.; BERGH, B. The origins and taxonomy of avocado (*Persea americana*) mill. Lauraceae. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 275, p. 387–394, 1990. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.1990.275.47>>.

SKENE, K. G. M.; BARLASS, M. *In vitro* culture of abscised immature avocado embryos. **Annals of Botany**, Oxford, v. 52, p. 667–672, 1983.

THORPE, T. A.; YEUNG, E. C. **Plant embryo culture –methods and protocols**. New Delhi: Humana Press, 2011.

TRAUB, H. P.; AUCHTER, E. C. Sprouting and grafting fractional parts of avocado embryos with attached cotyledonous material. **Science**, Washington, v. 78, n. 2026, p. 389–390, 1933.

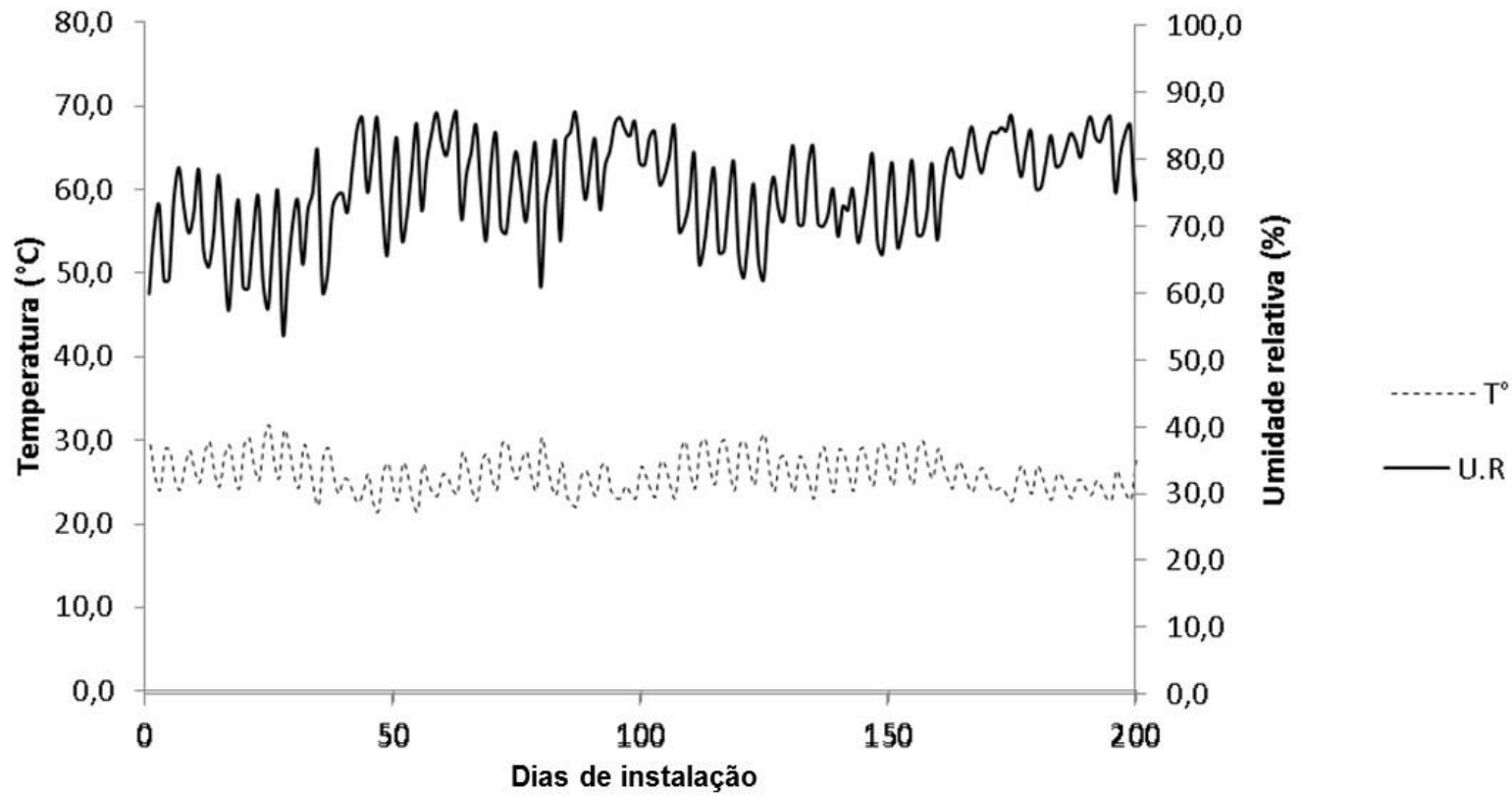
VIÑA, G. D. L.; PLIEGO-ALFARO, F.; DRISCOLL, S. P.; MITCHELL, V. J.; PARRY, M. A.; David W.; LAWLOR, D. W. Effects of CO₂ and sugars on photosynthesis and composition of avocado leaves grown *in vitro*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Issy les Moulineaux, v. 37, n. 7–8, p. 587–595, 1999. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)80111-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0981-9428(00)80111-4)>.

VON TEICHMAN, I.; VAN WYK, A. E. Structural aspects and trends in the evolution of recalcitrant seeds in dicotyledons. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 4, n. 2, p. 225–239, 2008.

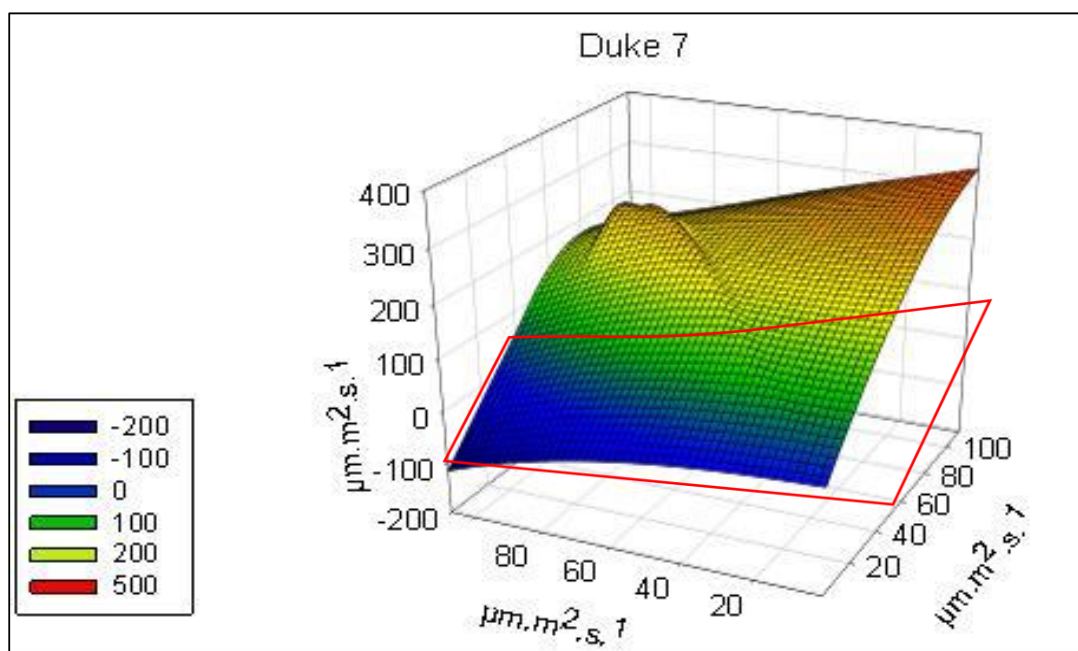
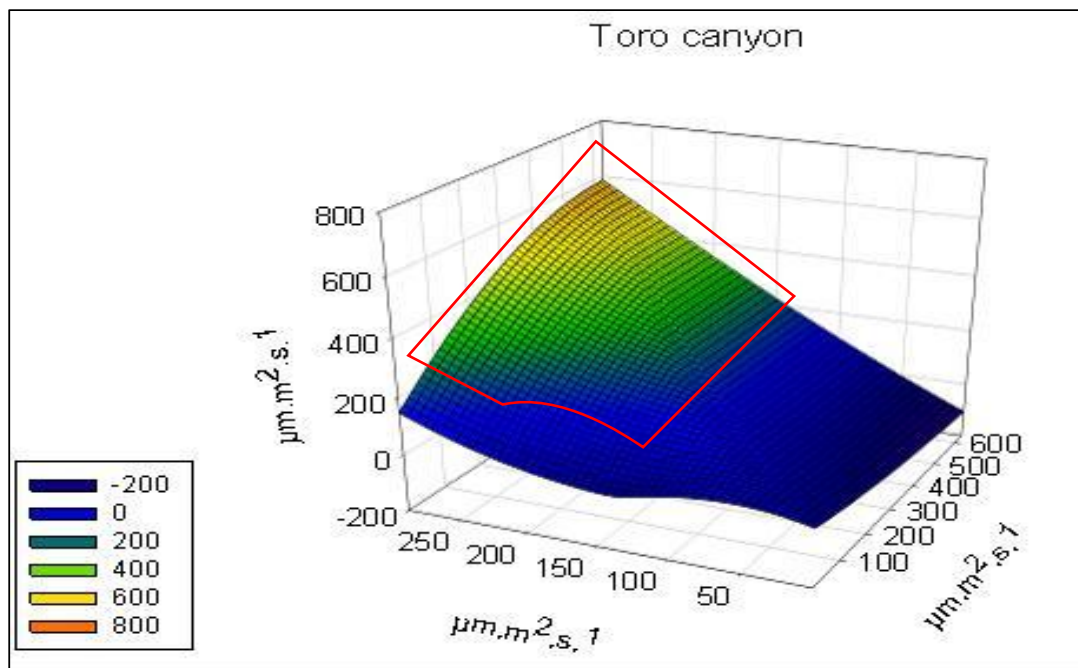
WADA, S.; NIEDZ, R. P.; REED, B. M. Determining nitrate and ammonium requirements for optimal *in vitro* response of diverse pear species. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Heidelberg, v. 51, n. 1, p. 19–27, 2015.

APÊNDICES

Apêndice 1 – Condições de temperatura e umidade da sala de crescimento para o desenvolvimento dos explantes obtidos por enxertia usados para micropropagação.



Apêndice 2 – Irradiância na casa de vegetação para o desenvolvimento das mudas de abacateiro sob tratamento com *Phytophthora cinnamomi*. A Área para mudas de Toro canyon; b. Área para mudas de Duke 7 (os quadrados vermelhos indicam a localização das plantas).



Apêndice 3 – Preparo das lâminas para microscopia ótica do caule de mudas de abacateiro na região de inoculação com *Phytophthora cinnamomi*: Serie gradual de álcool utilizada na desidratação; Coloração utilizada no preparo para análise das laminas histológicas.

Passos	Álcool (%)	Tempo (h)	Quantidade mL			
			Água destilada	Etanol 95%	Etanol 100%	TBA 100%
1	70	2	30	50	0	20
2	85	2	15	50	0	35
3	95	2	0	45	0	55
4	100	2	0	0	25	75
5	100	24	0	0	0	100
6	100	24	0	0	0	100
7	100	24	0	0	0	100

Passos	Soluções	Tempo (minutos)
1	Xilol	10
2	Xilol	10
3	Xilol	10
4	Xilol - Etanol absoluto (1:1)	5
5	Etanol (100%)	5
6	Etanol (100%)	5
7	Etanol (95%)	5
8	Etanol (80%)	5
9	Safranina O	30
10	Lavagem em água corrente	3-5
11	Etanol (90%)	2-3
12	Etanol (95%)	2-3
13	Etanol (100%)	2-3
14	Etanol (100%)	2-3
15	Etanol + Xilol (3:1)	3
16	Etanol + Xilol (1:1)	3
17	Etanol + Xilol (1:3)	3
18	Xilol	5
19	Xilol	5

Apêndice 4 – Análise química da água usada durante o desenvolvimento do experimento para irrigação das mudas de abacateiro inoculadas com *Phytophthora cinnamomi*.



unesp  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

RESULTADO DE ANÁLISE DE ÁGUA

REF.LAB.: 127 / 2014

INTERESSADO: **EDWIN GUTIERREZ**
ENDEREÇO: **edunillanos@hotmail.co**
TELEFONE: **(16) 9 9605 0325**

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA: **ÁGUA**
DATA E HORA DA COLHEITA: **30 / 06 / 2014 08:00 horas**
RESPONSÁVEL PELA COLHEITA: **O Interessado.**
EMBALAGEM E ACONDICIONAMENTO: **Garrafa de plástico, ~1000 cm³.**

DETERMINAÇÕES ⁽¹⁾	RESULTADOS	UNIDADE
1. Cálcio	18,0	mg/L Ca
2. Magnésio	1,1	mg/L Mg
3. Sódio	18,3	mg/L Na
4. Potássio	2,6	mg/L K

(1) Realizadas seguindo a metodologia do *Standard methods for the examination of water and wastewater*: APHA-AWWA, 1998;

Jaboticabal, 22 de julho de 2014.


Prof. Dr. Jairo Osvaldo Cazetta
Laboratório de Química Geral e Analítica
Departamento de Tecnologia

Apêndice 5 – Composição do meio de cultivo *Cenoura-Agar* e *Lima Bean Agar* para crescimento de *Phytophthora cinnamomi*.

Cenoura- agar (CA)

16 g ágar, 2 g CaCO₃, 200 g de cenoura e 900 ml de água destilada.

Liquidificar a cenoura na velocidade máxima por 40 segundos, filtrar o extrato, usando gaze (quatro capas), e leve até um litro com água deionizada, adicione o carbonato de cálcio e o ágar, e autoclave.

Lima bean extract agar (LBA)

- Feijão Lima (285 g) congelados e 1 L de água destilada ou deionizada, filtrar o extrato, usando gaze (quatro capas), e leve até um litro com água deionizada, adicione 15 g ágar e autoclave. Armazene no escuro.